

Process for the preparation of biologically active NGF by genetic engineering.

Patent Number: EP0544293
Publication date: 1993-06-02
Inventor(s): STERN ANNE DR (DE); BARTKE ILSE DR (DE); LANG KURT DR (DE); NAUJOKS KURT DR (DE); RUDOLPH RAINER PROF DR (DE)
Applicant(s): BOEHRINGER MANNHEIM GMBH (DE)
Requested Patent: ☐ EP0544293, A3, B1
Application Number: EP19920120207 19921126
Priority Number (s): DE19914139000 19911127
IPC Classification: A61K37/02; C07K3/08; C12N1/21; C12N15/12; C12N15/58; C12N15/62
EC Classification: C07K14/48, C07K1/113D2C, C12N9/72B
Equivalents: ☐ DE4139000, JP2611102B2, JP2637392B2, ☐ JP6327489, ☐ JP9023883

Abstract

For the preparation of biologically active beta -NGF (nerve growth factor) by genetic engineering by expression of an appropriate DNA sequence in prokaryotes as host cells, a DNA sequence is used which is composed in the 5'-3'-direction of sequences which code for (a) methionine as a starting amino acid, (b) 3 to 5 amino acids of an n-terminal sequence of a protein which can be expressed in the host cells used with a high expression rate, (c) 4 to 10 amino acids from the pro sequence of the beta -NGF precursor and (d) the 118 amino acids of the mature beta -NGF which, after expression of this DNA sequence in insoluble aggregates of inactive beta -NGF obtained from E. coli, are converted into a soluble active form by (1) solubilisation, (2) if appropriate dialysis and/or derivatisation of the resulting beta -NGF with the oxidised form of a compound, whose reduced form contains sulphydryl groups and whose oxidised form is a dimer of the compound bonded via a disulphide bridge, to give the mixed disulphide, and (3) naturation with the aid of a redox system consisting of a compound in oxidised and/or reduced form, whose reduced form contains sulphydryl groups and whose oxidised form contains a dimer bonded via a disulphide bridge, and removing, if appropriate subsequently with the aid of a protease, the amino acids of the sequences (a) and/or (b) and/or (c) and/or up to 9 N-terminal amino acids of the sequence (d). An active beta -NGF is obtained which contains less than 5% of beta -NGF degradation products or beta -NGF modified by a Met radical at the N terminus and is preferably free of other mammalian cell proteins and can be shortened or lengthened at the

N terminus. 

Data supplied from the esp@cenet database - I2



Europäisches Patentamt
European Patent Office
Office européen des brevets



Veröffentlichungsnummer: **0 544 293 A2**

EUROPÄISCHE PATENTANMELDUNG

Anmeldenummer: **92120207.3**

Anmeldetag: **26.11.92**

Int. Cl.⁵ **C12N 15/12, C12N 15/62,
C12N 15/58, A61K 37/02,
C07K 3/08, C12N 1/21,
/(C12N1/21,C12R1:19)**

Priorität: **27.11.91 DE 4139000**

Veröffentlichungstag der Anmeldung:
02.06.93 Patentblatt 93/22

Benannte Vertragsstaaten:
**AT BE CH DE DK ES FR GB GR IE IT LI LU NL
PT SE**

Anmelder: **BOEHRINGER MANNHEIM GMBH**
Sandhofer Strasse 112-132
W-6800 Mannheim-Waldhof(DE)

Erfinder: **Lang, Kurt, Dr.**
Langoner Strasse 10
W-8122 Penzberg(DE)
Erfinder: **Bartke, Ilse, Dr.**
Eichenstrasse 25

W-8139 Bernried(DE)
Erfinder: **Naujoks, Kurt, Dr.**
Buchenstrasse 3
W-8122 Penzberg(DE)
Erfinder: **Rudolph, Rainer, Prof. Dr.**
Färbergasse 17
W-8120 Weilheim(DE)
Erfinder: **Stern, Anne, Dr.**
Karwendelstrasse 10
W-8122 Penzberg(DE)

Vertreter: **Huber, Bernhard, Dipl.-Chem. et al**
Patentanwälte H. Welckmann, Dr. K. Fincke
F.A. Weickmann, B. Huber Dr. H. Liska, Dr. J.
Prechtel Kopernikusstrasse 9 Postfach 86 08
20
W-8000 München 86 (DE)

Verfahren zur gentechnologischen Herstellung von biologisch aktivem beta-NGF.

Zur gentechnologischen Herstellung von biologisch aktivem β -NGF (Nerve Growth Factor) durch Expression einer entsprechenden DNA-Sequenz in Prokaryonten als Wirtszellen, verwendet man eine DNA-Sequenz, welche in 5'-3'-Richtung zusammengesetzt ist aus Sequenzen, die für

- Methionin als Startamino-säure,
- 3 bis 5 Aminosäuren einer N-terminalen Sequenz eines Proteins, welches in den verwendeten Wirtszellen mit einer hohen Expressionsrate exprimierbar ist,
- 4 bis 10 Aminosäuren aus der Pro-Sequenz des β -NGF-Precursors und
- die 118 Aminosäuren des reifen β -NGF

codieren, die nach Expression dieser DNA-Sequenz in E.coli erhaltenen unlöslichen Aggregate von inaktivem β -NGF werden durch

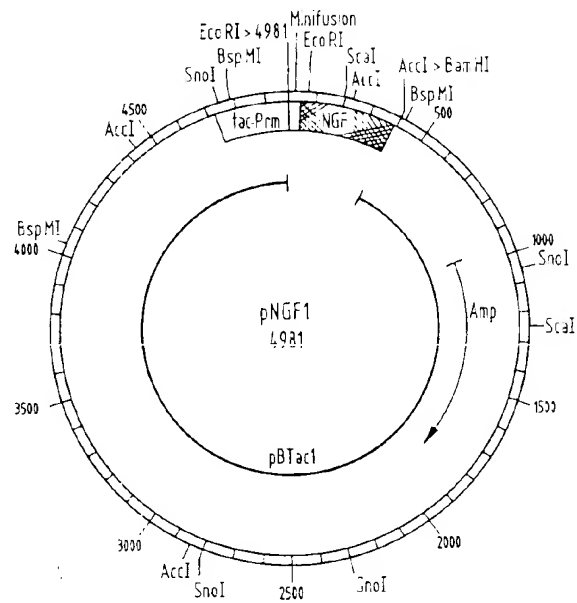
- Solubilisierung,
- gegebenenfalls Dialyse oder/und Derivatisierung des erhaltenen β -NGF mit der oxidierten Form einer Verbindung, deren reduzierte Form Sulfhydrylgruppen aufweist und deren oxidierte Form ein über eine Disulfidbrücke gebildetes Dimere der Verbindung ist zum gemischten Disulfid, und

Aminosäuren der Sequenzen (a), (b) oder (c) und (d) verändert werden, um die Expression zu erhöhen. Man erhält einen aktiven β -NGF, der weniger als 5 % β -NGF-Acetylpromote oder durch einen

Met-Rest am N-Terminus modifizierten β -NGF aufweist und vorzugsweise frei ist von anderen Säugerzellproteinen und N-terminal verkürzt oder verlängert sein kann.

Abb.1

Plasmid pNGF1



Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur gentechnologischen Herstellung von biologisch aktivem β -NGF durch Expression einer entsprechenden DNA-Sequenz in Prokaryonten als Wirtszellen, rekombinanten modifizierten β -NGF, eine DNA-Sequenz sowie einen Expressionsvektor und die Verwendung des rekombinanten modifizierten β -NGF in einer therapeutischen Zusammensetzung.

5 Nerve Growth Factor (NGF) ist ein Multikomponenten-Protein mit einem Molekulargewicht von ungefähr 130.000 Dalton. Es besteht aus den drei Untereinheiten α , β und γ . Seine Fähigkeit, das Wachstum von sensorischen Neuronen und sympathischen Neuronen zu bewirken, liegt jedoch lediglich in der β -Untereinheit. Der α -Untereinheit konnte bisher noch keine biologische Aktivität zugeordnet werden, während die γ -Untereinheit zumindest in einigen Zellspezies für die Prozessierung des β -NGF verantwortlich ist,
10 welcher zunächst als langer Precursor (Vorläufer) synthetisiert wird. Der reife β -NGF besteht vermutlich aus 118 Aminosäuren. Er enthält 3 Disulfidbrücken und ist nicht glykosyliert. Um biologisch aktiv zu sein, muß er als Dimer vorliegen.

Nerve Growth Factor ist besonders interessant für die Behandlung von neurologischen Krankheiten wie z.B. der Alzheimer'schen Krankheit oder Parkinson'schen Krankheit. Es wurde daher bereits versucht,
15 nachdem 1983 erstmals die cDNA-Sequenz beschrieben worden war (Ullrich et al., Nature Vol. 303 (1983), 821-825), das Protein auf gentechnologischem Wege herzustellen.

So wird in der EP-B 0 121 338 die DNA- und die Aminosäuresequenz von β -NGF sowie - hypothetisch - die Expression in E.coli beschrieben. Es wird in diesem europäischen Patent zwar ausgeführt, wie das Gen für β -NGF isoliert wurde und wie daraus die Sequenz erhalten wurde, jedoch wird für die direkte
20 Expression in E.coli lediglich angegeben, welches Expressionssystem verwendet wurde. Es konnte hierbei jedoch kein aktives Protein erhalten werden.

In der EP-A 0 329 175 wird die Herstellung von aktivem humanem β -NGF unter Verwendung eines Fusionsgens beschrieben, in welchem dem β -NGF-Gen eine Erkennungssequenz für die Spaltung mit Thrombin vorangestellt ist. Die Fusion wird hierbei durch Thrombin nach der Expression des Fusionsproteins gespalten. Der Nachteil dieses Verfahrens liegt u.a. in der geringen Ausbeute an biologisch aktivem β -NGF.
25

In der EP-A 0 370 171 wird ein Verfahren zur Herstellung von aktivem β -NGF unter Verwendung eines Bakulovirus-Expressionssystems beschrieben. Dabei werden virusinfizierte Insektenzellen zur Expression verwendet. Die Kultivierung derartiger Zellen ist jedoch sehr aufwendig, wobei auch noch nicht deren
30 Verwendbarkeit als wirtschaftlich interessante Produktionszellen gezeigt werden konnte.

In Biochem.Biophys. Research Commun. 171 (1990) 116-122 und EP-A 0 414 151 wird die Herstellung von aktivem β -NGF aus Eukaryonten beschrieben. Die Expression von rekombinanten Proteinen in eukaryontischer Zellen ist jedoch aufwendig und teuer.

In Gene 70 (1988), S. 57-65 wird die Expression von murinem β -NGF in E.coli beschrieben. Die
35 Ausbeute an biologisch aktivem β -NGF war jedoch sehr gering.

In der EP-A 0 450 386 wird ein Verfahren zur Herstellung von β -NGF aus E.coli beschrieben. Das dabei erhaltene Produkt ist jedoch ein Gemisch aus β -NGF der natürlichen Sequenz und β -NGF mit einem N-terminalen Methioninrest im Verhältnis von ca. 85:15.

In Gene 83 (1989), S. 65-74 wird die Expression von humanem β -NGF in Hefe beschrieben. Auch hier
40 ist die Expression nur gering, sowie die Aktivität des erhaltenen β -NGF nur sehr schwach.

Aufgabe der Erfindung war es daher, ein Verfahren bereitzustellen, welches die kostengünstige und einfache Herstellung von aktivem humanem β -NGF in Prokaryonten, insbesondere in E.coli ermöglicht, wobei eine hohe Expressionsrate und nach Naturierung ein Protein mit gleicher Aktivität wie ein aus natürlichen Quellen isolierter β -NGF erzielt werden sollte.

45 Gelöst wird die Aufgabe erfindungsgemäß durch ein Verfahren zur gentechnologischen Herstellung von biologisch aktivem β -NGF (Nerve Growth Factor β -subunit) durch Expression einer entsprechenden DNA-Sequenz in Prokaryonten als Wirtszellen, bei dem man eine DNA-Sequenz verwendet, welche in 5'-3'-Richtung zusammengesetzt ist aus Sequenzen, die für

- (a) Methionin als Startaminosäure,
 - 50 (b) 3 bis 5 Aminosäuren einer N-terminalen Sequenz eines Proteins, welches in den verwendeten Wirtszellen mit einer hohen Expressionsrate exprimierbar ist.
 - (c) 4 bis 10 Aminosäuren aus der Pro-Sequenz des β -NGF-Precursors und
- 118 Aminosäuren des reifen β -NGF

(3) Naturierung mit Hilfe eines Redoxsystems, bestehend aus einer Verbindung in oxidierter oder/und reduzierter Form, deren reduzierte Form Sulfhydrylgruppen aufweist und deren oxidierte Form ein über eine Disulfidbrücke verbundenes Dimer ist.

in eine lösliche aktive Form überführt und gegebenenfalls anschließend mit Hilfe einer Protease die Aminosäuren der Sequenz (a) und/oder (b) und/oder (c) abspaltet.

Mit Hilfe des erfindungsgemäßen Verfahrens wird es ermöglicht, β -NGF in hohen Ausbeuten in Prokaryonten herzustellen. In Prokaryonten fällt das Protein zunächst in Form von unlöslichen Aggregaten, sogenannten Inclusion Bodies (IBs) an und wird dann erst in die lösliche aktive Form übergeführt. Auf diese Weise wird zunächst ein biologisch aktiver β -NGF, der eine zusätzliche N-terminale Aminosäuresequenz enthält, erhalten (N-terminal verlängerter β -NGF), der ebenfalls Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist. Nach Abspaltung der vor den Aminosäuren der reifen β -NGF-Kette liegenden zusätzlich vorhandenen Aminosäuren mit Hilfe einer Protease kann dann auch ein zu reifem humanem β -NGF identisches Protein erhalten werden. Da humaner β -NGF nicht glykosyliert ist, führt die Herstellung in Prokaryonten hier zu keinen Unterschieden zum natürlichen Produkt. Überraschenderweise hat sich gezeigt, daß bis zu 9 der ersten N-terminalen Aminosäuren abgespalten werden können, ohne daß die Aktivität von β -NGF verloren geht. Ein derartig N-terminal verkürzter β -NGF sowie das Verfahren zu seiner Herstellung sind ebenfalls Gegenstand der Erfindung.

Die im erfindungsgemäßen Verfahren verwendete DNA-Sequenz entspricht der von Ullrich et al., Nature 303 (1983), 821-825 beschriebenen. Hierzu kann entweder in üblicher Weise die cDNA hergestellt werden. Auch eine Synthese einer DNA-Sequenz, bestehend aus den Exons des natürlichen Gens wäre möglich.

Im erfindungsgemäßen Verfahren werden für den Erhalt einer hohen Ausbeute an Protein der DNA-Sequenz von β -NGF das Kodon für die Startaminosäure Methioninsäure sowie Kodons für Aminosäuren vorangestellt, von denen bekannt ist, daß 3-5 Aminosäuren einer N-terminalen Sequenz eines Proteins entsprechen, welches in dem verwendeten Wirtstamm gut exprimiert wird. Dies ist bei Verwendung insbesondere von E.coli-Stämmen, vorzugsweise eine DNA-Sequenz, welche für die Aminosäuren der N-terminalen Sequenz Ser-Tyr-Gln-Val-Ile (SEQ ID NO 4) von tPA (Tissue Plasminogen Activator) codieren. Insbesondere sind dies Kodons, welche für die Aminosäuren Ser-Tyr-Gln (SEQ ID NO 3) codieren.

Es wurde weiterhin festgestellt, daß bei Verwendung wenigstens einiger Aminosäuren aus der Pro-Sequenz des β -NGF-Precursors ebenfalls die Expressionsrate positiv beeinflusst wird. Vorzugsweise werden hierzu in die DNA-Sequenz Kodons eingeführt, die für Aminosäuren codieren, welche sich im Precursor direkt vor der Aminosäuresequenz des reifen β -NGF befinden. Insbesondere werden Kodons verwendet, die für die letzten 7 Aminosäuren der Pro-Sequenz (Arg-Thr-His-Arg-Ser-Lys-Arg) (SEQ ID NO 2) codieren.

In einer bevorzugten Ausführungsform der Erfindung wird die Expression in E.coli als Wirtszellen und insbesondere im Stamm E.coli C600⁺ (DSM 5443) durchgeführt.

Die zur Expression einer DNA-Sequenz nötigen Faktoren sind dem Fachmann bekannt, hierzu gehören u.a. ein Promotor, ribosomale Bindungsstellen etc., welche auf den üblichen, für die Expression verwendeten Vektoren vorhanden sind. Im erfindungsgemäßen Verfahren ist es jedoch bevorzugt, einen induzierbaren Promotor zu verwenden und die Induktion dieses Promotors in der logarithmischen Wachstumsphase durchzuführen. Hierdurch wird es ermöglicht, eine besonders hohe Proteinausbeute zu erhalten, da nicht bereits in einer früheren Wachstumsphase die Expression des Fremdproteins zu einem Absterben der Wirtszellen führt. Beispiele für solche induzierbaren Promotoren sind der tac-Promotor, der durch Zugabe von IPTG induzierbar ist, der trp-Promotor oder der λ P_L-Promotor.

Die Solubilisierung, Derivatisierung sowie Naturierung - zusammen auch Renaturierung genannt - von Proteinen, welche nach Expression in E.coli in Form von Inclusion Bodies anfallen, ist an sich bekannt und z.B. in der EP-A 0 219 874 beschrieben.

Die Solubilisierung - sie führt zu inaktivem, löslichem Protein - erfolgt mit Hilfe eines Denaturierungsmittels, vorzugsweise Guanidiniumhydrochlorid oder Harnstoff, wobei eine Konzentration des Denaturierungsmittels von 4 bis 6 mol/l (Guanidiniumhydrochlorid) und 5 bis 8 mol/l (Harnstoff) zu guten Ergebnissen führt.

Nach einer eventuellen Dialyse (diese ist nicht unbedingt nötig, jedoch wird sie vorzugsweise durchgeführt) kann dann gegebenenfalls eine Derivatisierung des Proteins zum gewünschten Disulfid erfolgen. In einer bevorzugten Ausführungsform wird im erfindungsgemäßen Verfahren die Derivatisierung mit GSSG, Cystamin oder Cystin durchgeführt. Vorzugsweise werden diese Verbindungen dem Inkubationsansatz in Mengen von bis zu 75 mmol/l zugegeben.

Salz und oder Arginin (analog EP-A 0 219 874) durchgeführt. Bevorzugt wird dabei im pH-Bereich zwischen 8 und 10 gearbeitet.

Die Naturierung, welche die solubilisierten bzw. derivatisierten Proteine in die letztendlich aktive lösliche Form überführt, wird erfindungsgemäß vorzugsweise mit oxidiertem Glutathion (GSSG) und/oder GSH, Cystin und/oder Cystein, Cystamin und/oder Cysteamin durchgeführt. Wurde keine Derivatisierung durchgeführt, ist es im erfindungsgemäßen Verfahren besonders bevorzugt, mit Cystamin, GSSG oder Cystin bzw. den Redoxsystemen Cystamin/Cysteamin, GSH/GSSG oder Cystin/Cystein zu naturieren. Wurde jedoch das Protein in die gemischten Disulfide überführt, also derivatisiert, wird vorzugsweise nur mit reduzierten Verbindungen naturiert. Die hierbei vorteilhaften Konzentrationen und weiteren Reaktionsbedingungen können leicht durch Orientierungsversuche festgestellt werden.

Besonders bevorzugt wird eine Pulsrenaturierung gemäß EP-A 0 241 022 durchgeführt.

Die Temperatur sollte bei der gesamten Renaturierung zweckmäßig zwischen 0 und 30°C im Reaktionsansatz liegen. Bei der Naturierung ist es jedoch bevorzugt, eine Temperatur von 2 bis 10°C einzuhalten, da die Ausbeute an aktivem β -NGF mit abnehmender Temperatur zunimmt. Vorzugsweise wird 2 bis 60 Stunden naturiert. Eine verlängerte Naturierung führt zu einer höheren Ausbeute an biologisch aktivem Protein.

Um aus dem nach dem bisherigen Vorgehen erhaltenen modifizierten (N-terminal verlängerten) rekombinanten β -NGF die dem natürlichen β -NGF entsprechende Form zu erhalten, werden erfindungsgemäß die Sequenzen (a), (b) und (c) mit Trypsin, Endoproteinase Arg C oder einer Protease homologer Spezifität abgespalten. Die Aminosäure Methionin (Sequenz a) wird bereits durch E. coli eigene Proteasen abgespalten.

Um rekombinanten β -NGF zu erhalten, der um bis zu 9 Aminosäuren N-terminal verkürzt ist, wird vorzugsweise Trypsin oder eine Protease mit Trypsin-ähnlicher Spezifität zugesetzt.

Mit Hilfe des erfindungsgemäßen Verfahrens ist es möglich, rekombinanten biologisch aktiven β -NGF herzustellen, der gleiche Aktivitäten aufweist wie natürlicher humaner β -NGF, um die Sequenz (a), (b) und (c) verlängert oder um bis zu 9 Aminosäuren N-terminal verkürzt ist. Ein wesentlicher Vorteil des erfindungsgemäßen Verfahrens besteht darin, daß reproduzierbar einheitliche Proteine und nicht wie beispielsweise in EP-A 0 450 386 beschriebenen Proteingemische (aus β -NGF mit und ohne N-terminalen Methioninrest) erhalten werden. Bei Verwendung von Endoproteinase Arg C oder der Protease Kex2 (PNAS 86 (1989) 1434-1438; Biochemistry 40 (1991) 367-372) zur Spaltung wird rekombinanter β -NGF der natürlichen Sequenz erhalten, welcher leicht (z.B. über eine Mono-S-Säule) zu isolieren ist und dann 5% und weniger an Verunreinigungen durch modifizierten β -NGF oder β -NGF-Spaltprodukte enthält. Vorzugsweise enthält der rekombinante β -NGF 2% und weniger an diesen Verunreinigungen. Bei Verwendung der Protease Kex2 kann β -NGF zusätzlich völlig frei von anderen Säugerzellproteinen erhalten werden. Die Proteasespaltung kann vor oder nach der Reinigung des naturierten Produkts erfolgen.

Ein weiterer Gegenstand der Erfindung ist somit ein rekombinant hergestellter, isolierter β -NGF der natürlichen Sequenz, welcher 5% und weniger, vorzugsweise 2% und weniger, an Verunreinigungen durch modifizierten β -NGF oder β -NGF-Spaltprodukten enthält und vorzugsweise frei von anderen Säugerzellproteinen ist.

Das Protein wird erfindungsgemäß in hohen Ausbeuten erhalten und weist eine hohe Aktivität auf. Durch die erfindungsgemäße Verfahrensführung, bei der die nach Expression erhaltenen unlöslichen Aggregate zuerst renaturiert werden und dann erst eine Abspaltung der Sequenzen (a), (b) und (c) erfolgt, wird gewährleistet, daß bereits vor der Abspaltung die richtige Faltung und auch die für die biologische Aktivität nötige Dimerisierung des Proteins stattgefunden hat. Dadurch sind Proteasespaltungsstellen z.B. für Trypsin innerhalb des Proteins nicht mehr zugänglich und eine Abspaltung lediglich der Sequenzen (a), (b) und (c) und gegebenenfalls von bis zu 9 Aminosäuren des N-Terminus kann durchgeführt werden.

Die Dimerisierung zum natürlich wirksamen aktiven Protein erfolgt während der Renaturierung. Bei der Erkennung durch Antikörper unterscheidet sich weder das N-terminal verlängerte oder verkürzte rekombinante β -NGF noch das nach Abspaltung der Pro-Sequenz erhaltene Molekül von natürlichem 2,5 S-NGF aus Maus.

Ein weiterer Gegenstand der Erfindung ist daher ein rekombinanter N-terminal verlängerter β -NGF, der

Sequenz (a) (b) (c) (d) (e) (f) (g) (h) (i) (j) (k) (l) (m) (n) (o) (p) (q) (r) (s) (t) (u) (v) (w) (x) (y) (z) (aa) (ab) (ac) (ad) (ae) (af) (ag) (ah) (ai) (aj) (ak) (al) (am) (an) (ao) (ap) (aq) (ar) (as) (at) (au) (av) (aw) (ax) (ay) (az) (ba) (bb) (bc) (bd) (be) (bf) (bg) (bh) (bi) (bj) (bk) (bl) (bm) (bn) (bo) (bp) (bq) (br) (bs) (bt) (bu) (bv) (bw) (bx) (by) (bz) (ca) (cb) (cc) (cd) (ce) (cf) (cg) (ch) (ci) (cj) (ck) (cl) (cm) (cn) (co) (cp) (cq) (cr) (cs) (ct) (cu) (cv) (cw) (cx) (cy) (cz) (da) (db) (dc) (dd) (de) (df) (dg) (dh) (di) (dj) (dk) (dl) (dm) (dn) (do) (dp) (dq) (dr) (ds) (dt) (du) (dv) (dw) (dx) (dy) (dz) (ea) (eb) (ec) (ed) (ee) (ef) (eg) (eh) (ei) (ej) (ek) (el) (em) (en) (eo) (ep) (eq) (er) (es) (et) (eu) (ev) (ew) (ex) (ey) (ez) (fa) (fb) (fc) (fd) (fe) (ff) (fg) (fh) (fi) (fj) (fk) (fl) (fm) (fn) (fo) (fp) (fq) (fr) (fs) (ft) (fu) (fv) (fw) (fx) (fy) (fz) (ga) (gb) (gc) (gd) (ge) (gf) (gg) (gh) (gi) (gj) (gk) (gl) (gm) (gn) (go) (gp) (gq) (gr) (gs) (gt) (gu) (gv) (gw) (gx) (gy) (gz) (ha) (hb) (hc) (hd) (he) (hf) (hg) (hh) (hi) (hj) (hk) (hl) (hm) (hn) (ho) (hp) (hq) (hr) (hs) (ht) (hu) (hv) (hw) (hx) (hy) (hz) (ia) (ib) (ic) (id) (ie) (if) (ig) (ih) (ii) (ij) (ik) (il) (im) (in) (io) (ip) (iq) (ir) (is) (it) (iu) (iv) (iw) (ix) (iy) (iz) (ja) (jb) (jc) (jd) (je) (jf) (jg) (jh) (ji) (jj) (jk) (jl) (jm) (jn) (jo) (jp) (jq) (jr) (js) (jt) (ju) (jv) (jw) (jx) (jy) (jz) (ka) (kb) (kc) (kd) (ke) (kf) (kg) (kh) (ki) (kj) (kk) (kl) (km) (kn) (ko) (kp) (kq) (kr) (ks) (kt) (ku) (kv) (kw) (kx) (ky) (kz) (la) (lb) (lc) (ld) (le) (lf) (lg) (lh) (li) (lj) (lk) (ll) (lm) (ln) (lo) (lp) (lq) (lr) (ls) (lt) (lu) (lv) (lw) (lx) (ly) (lz) (ma) (mb) (mc) (md) (me) (mf) (mg) (mh) (mi) (mj) (mk) (ml) (mm) (mn) (mo) (mp) (mq) (mr) (ms) (mt) (mu) (mv) (mw) (mx) (my) (mz) (na) (nb) (nc) (nd) (ne) (nf) (ng) (nh) (ni) (nj) (nk) (nl) (nm) (nn) (no) (np) (nq) (nr) (ns) (nt) (nu) (nv) (nw) (nx) (ny) (nz) (oa) (ob) (oc) (od) (oe) (of) (og) (oh) (oi) (oj) (ok) (ol) (om) (on) (oo) (op) (oq) (or) (os) (ot) (ou) (ov) (ow) (ox) (oy) (oz) (pa) (pb) (pc) (pd) (pe) (pf) (pg) (ph) (pi) (pj) (pk) (pl) (pm) (pn) (po) (pp) (pq) (pr) (ps) (pt) (pu) (pv) (pw) (px) (py) (pz) (qa) (qb) (qc) (qd) (qe) (qf) (qg) (qh) (qi) (qj) (qk) (ql) (qm) (qn) (qo) (qp) (qq) (qr) (qs) (qt) (qu) (qv) (qw) (qx) (qy) (qz) (ra) (rb) (rc) (rd) (re) (rf) (rg) (rh) (ri) (rj) (rk) (rl) (rm) (rn) (ro) (rp) (rq) (rr) (rs) (rt) (ru) (rv) (rw) (rx) (ry) (rz) (sa) (sb) (sc) (sd) (se) (sf) (sg) (sh) (si) (sj) (sk) (sl) (sm) (sn) (so) (sp) (sq) (sr) (ss) (st) (su) (sv) (sw) (sx) (sy) (sz) (ta) (tb) (tc) (td) (te) (tf) (tg) (th) (ti) (tj) (tk) (tl) (tm) (tn) (to) (tp) (tq) (tr) (ts) (tt) (tu) (tv) (tw) (tx) (ty) (tz) (ua) (ub) (uc) (ud) (ue) (uf) (ug) (uh) (ui) (uj) (uk) (ul) (um) (un) (uo) (up) (uq) (ur) (us) (ut) (uu) (uv) (uw) (ux) (uy) (uz) (va) (vb) (vc) (vd) (ve) (vf) (vg) (vh) (vi) (vj) (vk) (vl) (vm) (vn) (vo) (vp) (vq) (vr) (vs) (vt) (vu) (vv) (vw) (vx) (vy) (vz) (wa) (wb) (wc) (wd) (we) (wf) (wg) (wh) (wi) (wj) (wk) (wl) (wm) (wn) (wo) (wp) (wq) (wr) (ws) (wt) (wu) (wv) (ww) (wx) (wy) (wz) (xa) (xb) (xc) (xd) (xe) (xf) (xg) (xh) (xi) (xj) (xk) (xl) (xm) (xn) (xo) (xp) (xq) (xr) (xs) (xt) (xu) (xv) (xw) (xx) (xy) (xz) (ya) (yb) (yc) (yd) (ye) (yf) (yg) (yh) (yi) (yj) (yk) (yl) (ym) (yn) (yo) (yp) (yq) (yr) (ys) (yt) (yu) (yv) (yw) (yx) (yy) (yz) (za) (zb) (zc) (zd) (ze) (zf) (zg) (zh) (zi) (zj) (zk) (zl) (zm) (zn) (zo) (zp) (zq) (zr) (zs) (zt) (zu) (zv) (zw) (zx) (zy) (zz) (aa) (ab) (ac) (ad) (ae) (af) (ag) (ah) (ai) (aj) (ak) (al) (am) (an) (ao) (ap) (aq) (ar) (as) (at) (au) (av) (aw) (ax) (ay) (az) (ba) (bb) (bc) (bd) (be) (bf) (bg) (bh) (bi) (bj) (bk) (bl) (bm) (bn) (bo) (bp) (bq) (br) (bs) (bt) (bu) (bv) (bw) (bx) (by) (bz) (ca) (cb) (cc) (cd) (ce) (cf) (cg) (ch) (ci) (cj) (ck) (cl) (cm) (cn) (co) (cp) (cq) (cr) (cs) (ct) (cu) (cv) (cw) (cx) (cy) (cz) (da) (db) (dc) (dd) (de) (df) (dg) (dh) (di) (dj) (dk) (dl) (dm) (dn) (do) (dp) (dq) (dr) (ds) (dt) (du) (dv) (dw) (dx) (dy) (dz) (ea) (eb) (ec) (ed) (ee) (ef) (eg) (eh) (ei) (ej) (ek) (el) (em) (en) (eo) (ep) (eq) (er) (es) (et) (eu) (ev) (ew) (ex) (ey) (ez) (fa) (fb) (fc) (fd) (fe) (ff) (fg) (fh) (fi) (fj) (fk) (fl) (fm) (fn) (fo) (fp) (fq) (fr) (fs) (ft) (fu) (fv) (fw) (fx) (fy) (fz) (ga) (gb) (gc) (gd) (ge) (gf) (gg) (gh) (gi) (gj) (gk) (gl) (gm) (gn) (go) (gp) (gq) (gr) (gs) (gt) (gu) (gv) (gw) (gx) (gy) (gz) (ha) (hb) (hc) (hd) (he) (hf) (hg) (hh) (hi) (hj) (hk) (hl) (hm) (hn) (ho) (hp) (hq) (hr) (hs) (ht) (hu) (hv) (hw) (hx) (hy) (hz) (ia) (ib) (ic) (id) (ie) (if) (ig) (ih) (ii) (ij) (ik) (il) (im) (in) (io) (ip) (iq) (ir) (is) (it) (iu) (iv) (iw) (ix) (iy) (iz) (ja) (jb) (jc) (jd) (je) (jf) (jg) (jh) (ji) (jj) (jk) (jl) (jm) (jn) (jo) (jp) (jq) (jr) (js) (jt) (ju) (jv) (jw) (jx) (jy) (jz) (ka) (kb) (kc) (kd) (ke) (kf) (kg) (kh) (ki) (kj) (kk) (kl) (km) (kn) (ko) (kp) (kq) (kr) (ks) (kt) (ku) (kv) (kw) (kx) (ky) (kz) (la) (lb) (lc) (ld) (le) (lf) (lg) (lh) (li) (lj) (lk) (ll) (lm) (ln) (lo) (lp) (lq) (lr) (ls) (lt) (lu) (lv) (lw) (lx) (ly) (lz) (ma) (mb) (mc) (md) (me) (mf) (mg) (mh) (mi) (mj) (mk) (ml) (mm) (mn) (mo) (mp) (mq) (mr) (ms) (mt) (mu) (mv) (mw) (mx) (my) (mz) (na) (nb) (nc) (nd) (ne) (nf) (ng) (nh) (ni) (nj) (nk) (nl) (nm) (nn) (no) (np) (nq) (nr) (ns) (nt) (nu) (nv) (nw) (nx) (ny) (nz) (oa) (ob) (oc) (od) (oe) (of) (og) (oh) (oi) (oj) (ok) (ol) (om) (on) (oo) (op) (oq) (or) (os) (ot) (ou) (ov) (ow) (ox) (oy) (oz) (pa) (pb) (pc) (pd) (pe) (pf) (pg) (ph) (pi) (pj) (pk) (pl) (pm) (pn) (po) (pp) (pq) (pr) (ps) (pt) (pu) (pv) (pw) (px) (py) (pz) (qa) (qb) (qc) (qd) (qe) (qf) (qg) (qh) (qi) (qj) (qk) (ql) (qm) (qn) (qo) (qp) (qq) (qr) (qs) (qt) (qu) (qv) (qw) (qx) (qy) (qz) (ra) (rb) (rc) (rd) (re) (rf) (rg) (rh) (ri) (rj) (rk) (rl) (rm) (rn) (ro) (rp) (rq) (rr) (rs) (rt) (ru) (rv) (rw) (rx) (ry) (rz) (sa) (sb) (sc) (sd) (se) (sf) (sg) (sh) (si) (sj) (sk) (sl) (sm) (sn) (so) (sp) (sq) (sr) (ss) (st) (su) (sv) (sw) (sx) (sy) (sz) (ta) (tb) (tc) (td) (te) (tf) (tg) (th) (ti) (tj) (tk) (tl) (tm) (tn) (to) (tp) (tq) (tr) (ts) (tt) (tu) (tv) (tw) (tx) (ty) (tz) (ua) (ub) (uc) (ud) (ue) (uf) (ug) (uh) (ui) (uj) (uk) (ul) (um) (un) (uo) (up) (uq) (ur) (us) (ut) (uu) (uv) (uw) (ux) (uy) (uz) (va) (vb) (vc) (vd) (ve) (vf) (vg) (vh) (vi) (vj) (vk) (vl) (vm) (vn) (vo) (vp) (vq) (vr) (vs) (vt) (vu) (vv) (vw) (vx) (vy) (vz) (wa) (wb) (wc) (wd) (we) (wf) (wg) (wh) (wi) (wj) (wk) (wl) (wm) (wn) (wo) (wp) (wq) (wr) (ws) (wt) (wu) (wv) (ww) (wx) (wy) (wz) (xa) (xb) (xc) (xd) (xe) (xf) (xg) (xh) (xi) (xj) (xk) (xl) (xm) (xn) (xo) (xp) (xq) (xr) (xs) (xt) (xu) (xv) (xw) (xx) (xy) (xz) (ya) (yb) (yc) (yd) (ye) (yf) (yg) (yh) (yi) (yj) (yk) (yl) (ym) (yn) (yo) (yp) (yq) (yr) (ys) (yt) (yu) (yv) (yw) (yx) (yy) (yz) (za) (zb) (zc) (zd) (ze) (zf) (zg) (zh) (zi) (zj) (zk) (zl) (zm) (zn) (zo) (zp) (zq) (zr) (zs) (zt) (zu) (zv) (zw) (zx) (zy) (zz)

Precursor vor der reifen Aminosäuresequenz, insbesondere die letzten 7. Die Aminosäuresequenz des besonders bevorzugten modifizierten β -NGF ist in Fig. 2 gezeigt.

Ein weiterer Gegenstand der Erfindung ist eine DNA-Sequenz, welche für den erfindungsgemäßen rekombinanten N-terminal verlängerten β -NGF codiert, sowie ein Expressionsvektor, der die erfindungsgemäße DNA-Sequenz enthält. Für die erfindungsgemäßen Expressionsvektoren sind hierbei dem Fachmann bekannte Vektoren geeignet, wie z.B. Plasmide. Ein solcher Expressionsvektor enthält alle für die Expression in bestimmten Wirtsorganismen nötigen Elemente wie Promotoren, ribosomale Bindungsstellen, Terminationssequenzen etc..

Erfindungsgemäß ist es bevorzugt, daß der Expressionsvektor einen induzierbaren Promotor enthält.

Ein solcher erfindungsgemäßer Expressionsvektor ist beispielsweise das Plasmid pNGF1, welches schematisch in Fig. 1 dargestellt ist.

N-terminal verlängerter und verkürzter β -NGF zeigen wie natürlicher β -NGF eine Wirkung auf Neuronen. Ein weiterer Gegenstand der Erfindung ist deshalb ihre Verwendung in einem Arzneimittel, ebenso wie die Verwendung des erfindungsgemäßen, rekombinant hergestellten β -NGF zu diesem Zweck.

Wiederum ein weiterer Gegenstand der Erfindung ist auch eine therapeutische Zusammensetzung, enthaltend neben üblichen Träger- und Hilfsstoffen einen erfindungsgemäßen rekombinant hergestellten, rekombinanten N-terminal verlängerten oder verkürzten β -NGF als aktiven Inhaltsstoff.

Die in der vorliegenden Anmeldung genannten Plasmide und Mikroorganismen sind bei der Deutschen Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (DSMZ), Mascheroder Weg 1b, D-3300 Braunschweig, unter den folgenden Hinterlegungsnummern hinterlegt:

E.coli C 600 +	DSMZ 5443
pUBS 520 in E.coli C 600 +	DSMZ 6786
pNGF1/pUBS 520 in E.coli C 600 +	DSMZ 6785.

Die folgenden Beispiele erläutern in Verbindung mit den Abbildungen und Sequenzprotokollen die Erfindung weiter.

Abb. 1 zeigt hierbei das erfindungsgemäße Plasmid pNGF1 in schematisierter Form.
Abb. 2 zeigt die Primärstruktur des auf der DNA-Ebene codierten erfindungsgemäßen rekombinanten β -NGF mit den Sequenzen b (Ser-Tyr-Gln (SEQ ID NO 3)) und c (Arg-Thr-His-Arg-Ser-Lys-Arg (SEQ ID NO 2)).

Abb. 3 zeigt die Abhängigkeit der Renaturierungsausbeute von der Guanidiniumhydrochloridkonzentration in der Renaturierungslösung.

Die Renaturierung erfolgte durch eine 1/100 Verdünnung eines dialysierten Solubilisats mit 20 mg IB/ml in 0,7 mol/l Arginin, 1,0 mol/l Harnstoff, 0,1 mol/l Tris, 2 mmol/l EDTA, 5 mmol/l Cysteamin, 1 mmol/l Cystamin, pH 8,7, 4°C, mit unterschiedlichen Konzentrationen an Guanidiniumhydrochlorid.

Abb. 4 zeigt die Abhängigkeit der Renaturierungsausbeute von der Proteinkonzentration in der Renaturierungslösung.

Die Renaturierung erfolgte durch eine 1/12,5 bis 1/1000-Verdünnung eines dialysierten Solubilisats mit 50 mg IB/ml in 0,7 mol/l Arginin, 2,0 mol/l Harnstoff, 0,1 mol/l Tris, 2 mmol/l EDTA, 5 mmol/l Cysteamin, 1 mmol/l Cystamin, pH 8,7. Guanidiniumhydrochlorid wurde in der Renaturierungslösung vor Zugabe des Solubilisats so aufgestockt, daß nach Zugabe des Solubilisats alle Lösungen 0,48 mol/l Guanidiniumhydrochlorid enthalten.

Abb. 5 zeigt die Abhängigkeit der Renaturierungsausbeute vom pH-Wert der Renaturierungslösung.

Die Renaturierung erfolgte durch 1/200-Verdünnung eines dialysierten Solubilisats mit 50 mg IB/ml in 0,7 mol/l Arginin, 2 mol/l Harnstoff, 0,1 mol/l Tris, 2 mmol/l EDTA, 5 mmol/l Cysteamin, 1 mmol/l Cystamin, pH 8,0 - 10,5, 4°C.

Abb. 6 zeigt ein UV-Spektrum von rekombinantem modifiziertem (N-terminal verlängerter) β -NGF in 50 mmol/l Tris HCl, 1 mmol/l EDTA, pH 7,5.

Abb. 7 zeigt eine Comassie-Blue Färbung eines SDS-Gels von rekombinantem β -NGF.

Abb. 8 zeigt ein SDS-Gelelektrophoreogramm von rekombinantem modifiziertem (N-terminal verlängerter) β -NGF in 50 mmol/l Tris HCl, 1 mmol/l EDTA, pH 7,5.

Abb. 9 zeigt ein SDS-Gelelektrophoreogramm von rekombinantem modifiziertem (N-terminal verlängerter) β -NGF in 50 mmol/l Tris HCl, 1 mmol/l EDTA, pH 7,5.

- SEQ ID NO 1 nase Arg C (Abb. 9b).
 zeigt die Aminosäuresequenz des rekombinanten β -NGF mit den N-terminalen Sequenzen SEQ ID NO 2 und 3.
 SEQ ID NO 2 zeigt einen Teil der Prosequenz des β -NGF Precursors
 5 SEQ ID NO 3 zeigt einen Teil der N-terminalen Aminosäuresequenz von tPA.
 SEQ ID NO 4 zeigt einen Teil der N-terminalen Aminosäuresequenz von tPA.
 SEQ ID NO 5 und 6 zeigen Oligonukleotide zur Konstruktion von pNGF1
 SEQ ID NO 7 zeigt die N-terminale Aminosäuresequenz von rec. NGF.
 SEQ ID NO 8 bis 10 zeigen die N-terminale Aminosäuresequenz verschiedener N-terminal verkürzter β -NGF-Derivate.

Beispiel 1

Expression von rekombinatem β -NGF (rec β -NGF, β -NGF-Minifusion) in *E.coli*

a) Konstruktion des Expressionsplasmids

Zur Herstellung des Expressionsplasmids wurden 3 Ansätze ligiert. Ansatz A stellt das etwa 4,6 kb große EcoRI/BamHI-Fragment des Plasmids pBTac1 dar. Das Plasmid pBTac1 wurde dazu mit den beiden
 20 Restriktionsenzymen EcoRI und BamHI behandelt. Der Restriktionsansatz wurde auf einem Agarose-Gel aufgetrennt. Das Fragment mit der Größe von etwa 4,6 kb wurde ausgeschnitten und die DNA aus dem Gel eluiert. Ansatz B wurde durch Restriktion des Plasmids pUC18-NGF (British Biotechnology, Code BBG26) hergestellt. Zur Restriktion wurden die beiden Enzyme BspMI und BamHI eingesetzt. Der Restriktionsansatz wurde gelelektrophoretisch aufgetrennt und ein BspMI/BamHI-Fragment von 370 bp präparativ gewonnen.

25 Ansatz C entstand durch das Annealing von zwei synthetisch hergestellten Oligonukleotiden mit folgender Sequenz:

Oligonukleotid 1: 5'-AATTCTTATGTCTTACCAAAGAACTCACCGTAGCAAGCGC-3' (SEQ ID NO. 5)

Oligonukleotid 2: 5'-ATGAGCGCTTGCTACGGTGAGTTCTTTGGTAAGACATAAG-3' (SEQ ID NO. 6)

In der Annealing-Reaktion wurden je 2 μ g Oligonukleotide pro 10 μ g eingesetzt; die Oligonukleotide wurden
 30 für 10 Minuten bei 68 °C inkubiert und auf Raumtemperatur abgekühlt.

Die 3 Ansätze wurden nach bekannten Methoden ligiert und in *E.coli* C600* (DSM 5443) zusammen mit dem Plasmid pUBS520 (beschrieben in Brinkmann et al., 1989, Gene 85, 109-114) transformiert. Durch Selektion auf Ampicillin und Kanamycin konnten die gewünschten Klone gefunden werden. Das erhaltene Plasmid pNGF1 ist in Figur 1 beschrieben und unterscheidet sich vom Ausgangsplasmid pBTac1 u.a.
 35 dadurch, daß es eine zweite Scal-Schnittstelle enthält. Die Aminosäuresequenz des codierten Proteins ist in Abb. 2 gezeigt.

b) Expressionsstudien

40 Einer der erhaltenen Klone wurde im Hinblick auf Expression der β -NGF-Minifusion untersucht. Dazu wurden die Zellen bei 37 °C bis zu einer optischen Dichte von 0,4 (gemessen bei 550 nm) wachsen gelassen. Die Expression des β -NGF-Fusionsproteins wurde durch die Zugabe von 5 mmol/l IPTG induziert. Die Zellen wurden für weitere 4 Stunden inkubiert und anschließend durch Zentrifugation konzentriert. Die Inclusion Bodies wurden nach bekannten Methoden (siehe Beispiel 2) präpariert und auf einem 15 % SDS-
 45 Polyacrylamidgel analysiert. Auf diese Weise konnte eine Expressionsstärke von mindestens 20 % bezogen auf das Gesamtprotein festgestellt werden.

Beispiel 2

50 Präparation von Inclusion Bodies (= IBs)

Die Zellen wurden bei 37 °C bis zu einer optischen Dichte von 0,4 (gemessen bei 550 nm) wachsen gelassen.

Die Zellen wurden bei 37 °C bis zu einer optischen Dichte von 0,4 (gemessen bei 550 nm) wachsen gelassen. Die Expression des β -NGF-Fusionsproteins wurde durch die Zugabe von 5 mmol/l IPTG induziert. Die Zellen wurden für weitere 4 Stunden inkubiert und anschließend durch Zentrifugation konzentriert. Die Inclusion Bodies wurden nach bekannten Methoden (siehe Beispiel 2) präpariert und auf einem 15 % SDS-Polyacrylamidgel analysiert. Auf diese Weise konnte eine Expressionsstärke von mindestens 20 % bezogen auf das Gesamtprotein festgestellt werden.

durchgeführt. Zur Aufschlußlösung wurde DNase ad 0,1 mg/ml und $MgSO_4$ ad 2 mmol/l zugegeben und die Lösung 30 Minuten bei 20°C inkubiert. Nach der DNase-Behandlung wurde die Lösung mit demselben Volumen 0,1 mol/l Tris/HCl, 6 % Triton-X-100, 1,5 mol/l NaCl, 60 mmol/l EDTA, pH 7,0 verdünnt und 20 Minuten im Eisbad inkubiert. Unlösliche Bestandteile (IBs) wurden anschließend durch Zentrifugation abgetrennt. Der Niederschlag wurde in 1 l 0,5 mol/l Guanidinium HCl (GdmCl), 20 mmol/l EDTA, pH 4,5 suspendiert. Nach 20 Minuten Inkubation bei 20°C wurden die IBs durch erneute Zentrifugation geerntet. Die folgende Resuspension des Niederschlags erfolgte in 1,5 l 0,1 mol/l Tris/HCl, 20 mmol/l EDTA, pH 6,5. Nach 30 Minuten Inkubation bei 20°C wurden die IBs durch eine weitere Zentrifugation im Niederschlag erhalten.

Zur Bestimmung des Anteils an β -NGF in den IBs wurden 500 mg IBs (Naßgewicht) mit einer Lösung aus 6 mol/l GdmCl, 0,1 mol/l Tris/HCl, 0,1 mol/l DTE, 5 mmol/l EDTA, pH 8,5 auf 10 ml aufgefüllt und 1 Stunde suspendiert. Der Proteingehalt der Lösung wurde mittels Proteinbestimmung nach Bradford (Bradford, M.M., Anal.Biochem. 1976, 72, 248) mit BSA als Eichprotein bestimmt. Der Anteil von β -NGF am Gesamtprotein in den gelösten IBs wurde nach Auftrennung der Proteine mittels SDS-Gelelektrophorese durch densitometrische Vermessung der Probenbahn ermittelt. Die in den aus 10 l Fermentationsbrühe isolierten IBs enthielten 6,0 g β -NGF.

Beispiel 3

20 Solubilisierung und Derivatisierung von rec. β -NGF

a) Herstellung von Solubilisat:

IBs wurden in einer Lösung aus 6 mol/l GdmCl, 0,1 mol/l DTE, 5 mmol/l EDTA, 0,1 mol/l Tris/HCl, pH 8,5 zu einer Konzentration von 5 bis 50 g IB/l suspendiert und 1 Stunde bei 25°C gerührt.

Teilweise wurde unmittelbar das so erzeugte Solubilisat für die anschließende Naturierung verwendet.

b) Herstellung von dialysiertem Solubilisat:

Alternativ wurde der pH-Wert des Solubilisats mit HCl (25 %) auf pH 3 eingestellt und die saure Lösung mehrfach gegen 6 mol/l GdmCl, 5 mmol/l EDTA, pH 3 dialysiert. Dieses Dialysat wurde sowohl zur Renaturierung als auch zur anschließenden Derivatisierung verwendet.

c) Herstellung von Derivaten:

Zur Herstellung der Derivate (gemischte Disulfide) wurde der pH-Wert des dialysierten Solubilisats durch Zugabe von 5 N NaOH auf pH 8,5 gestellt. Anschließend wurde mit 1 Volumen einer Lösung aus 6 mol/l GdmCl, 0,2 mol/l Tris HCl, 5 mmol/l EDTA pH 8,5 verdünnt und oxidiertes Glutathion (GSSG), Cystamin oder Cystin in fester Form bis zu einer Konzentration von 75 mmol/l zugegeben und 1 Stunde bei 20°C inkubiert. Im Falle von Cystin erfolgte die Inkubation bei pH 9,5 anstelle von pH 8,5. Anschließend wurde der pH-Wert der Lösung mit 25 % HCl auf pH 3 eingestellt und mehrmals gegen 6 mol/l GdmCl, 1 mmol/l EDTA, pH 3,0 dialysiert.

Beispiel 4

45 Naturierung von rec. β -NGF

Zur Darstellung von biologisch aktivem β -NGF aus den in Beispiel 3 hergestellten Solubilisaten und Derivaten wurden die β -NGF in inaktiver, löslicher Form enthaltenden Lösungen 12,5- bis 1000-fach in unterschiedliche Renaturierungspuffer verdünnt. Zur Ermittlung der optimalen Renaturierungsbedingungen wurden die Proteinkonzentration, der pH-Wert, die Temperatur sowie die Konzentration an Arginin, Tris HCl

15. Beispiel C), sowie ein Sandwich-Enzym-Immunoassay (β -NGF-ELISA) verwendet.

Für den DRG-Test wurden die Renaturierungslösungen nach 24 Stunden Inkubationszeit gegen 50 mmol/l Tris-HCl pH 7,5 dialysiert und anschließend durch Zentrifugation geklärt. In den Überständen wurden je 100 μ l pur oder nach Verdünnung mit Medium (F14-Medium: Coon, M.G. und Weiß, M.G., 1969, Proc.Natl.Acad.Sci. USA 62, 852-859) in 24-well (Vortiefung) Zellkulturplatten (Fa. Costar) mit 750 μ l Medium und 150 μ l Zellsuspension der dissoziierten Ganglien gemischt und 48 Stunden bei 37°C inkubiert. Als Maß für die biologische Aktivität wurde die Anzahl der Zellen mit ausgebildeten Dendriten quantifiziert. Als Referenz wurde eine Lösung bekannter Konzentration von 2,5 S-NGF aus Submaxillaris-Drüsen der Maus (Fa. Boehringer Mannheim) verwendet.

Für den β -NGF-ELISA wurden für den Vergleich der Ergebnisse mit dem DRG-Test ebenfalls gegen 50 mmol/l Tris-HCl pH 7,5 dialysierte Renaturierungslösungen verwendet. Ansonsten wurden die Renaturierungslösungen unmittelbar nach Klärung mittels Zentrifugation eingesetzt.

Zum Nachweis von renaturiertem β -NGF mittels ELISA wurde eine 96-well Mikrotiterplatte (Fa. Nunc-Immuno; Typ Maxisorp F96) mit einem monoklonalen Antikörper gegen Maus 2,5 S NGF (Fa. Boehringer Mannheim GmbH) beschichtet, indem pro well mit 0,1 ml Antikörperlösung aus 0,3 μ g Antikörper/ml 50 mmol/l Na_2CO_3 , 0,1 % Na-azid, pH 9,6 für 16 Stunden bei 4°C inkubiert wurde. Nach dreimaligem Waschen mit 0,2 ml 50 mmol/l Tris-HCl, 0,2 mol/l NaCl, 10 mmol/l CaCl_2 , 0,2 % Triton X-100, 0,1 % Na-azid, pH 7,0 pro well wurden je 100 μ l β -NGF-enthaltende Renaturierungslösungen sowie deren Verdünnungen in Waschpuffer mit zusätzlich 1 % BSA gefüllt. Zum Vergleich mit dem Zelltest wurden die entsprechenden dialysierten und zentrifugierten Lösungen verwendet, ansonsten wurden die Renaturierungslösungen unmittelbar nach Klärung mittels Zentrifugation eingesetzt. Als Referenz wurde eine Verdünnungsreihe von 2,5 S-NGF aus Submaxillaris-Drüsen der Maus (Fa. Boehringer Mannheim) im Konzentrationsbereich 0,1 μ g/ml bis 20 pg/ml je Platte mitgeführt. Nach 2 Stunden Inkubation bei 37°C wurde die Lösung durch dreimaliges Waschen entfernt. Anschließend wurde in jedes well 0,1 ml einer Lösung von β -Galactosidase-konjugierten monoklonalen Antikörper gegen Maus 2,5 S NGF (Fa. Boehringer Mannheim; 0,4 U/ml in Waschpuffer mit 1 % BSA) gegeben und 4 Stunden bei 37°C inkubiert.

Nach einem erneuten Waschzyklus wurde jedes well mit 0,2 ml einer Lösung von 40 mg Chlorphenolrot- β -D-galactopyranosid in 20 ml 100 mmol/l Hepes, 150 mmol/l NaCl, 2 mmol/l MgCl_2 , 0,1 % Na-azid, 1 % BSA pH 7 gefüllt. Je nach Farbentwicklung wurde nach 10 bis 60 Minuten die Absorption der Proben mit einem ELISA-Reader (z.B. Typ EAR 400 AT von Fa. SLT-Labinstruments, Austria) gemessen. Die β -NGF-Konzentration in Renaturierungslösungen wurde anhand der Eichkurve mit 2,5 S NGF aus Maus berechnet.

Sofern nicht anders vermerkt, wurden die Renaturierungslösungen nach einer Inkubationszeit von 24 Stunden analysiert.

35

40

45

50

Tabelle 1

Korrelation von DRG-Test und β -NGF-ELISA bei der Bestimmung
der Renaturierungsausbeute von β -NGF-GSSG-Derivat ($c = 15 \text{ mg}$
IB/ml) in Abhängigkeit von den Renaturierungsbedingungen

Alle Puffer enthielten $0,1 \text{ mol/l}$ Tris/HCl, 1 mmol/l EDTA,
pH 8,0 bei 20°C .

Zusätze und Änderungen sind in der Tabelle aufgeführt.

Verdünnung Derivat-Lsg.	Renaturierungs- Puffer-Zusätze	Aktivität im DRG-Test	ELISA- Signal
1/20	---	+	$\leq 5 \%$
1/20	1 mmol/l GSH	++	25 %
1/20	1 mmol/l GSH+ $0,5 \text{ mol/l}$ Arg	+++	100 %
1/20	1 mmol/l GSH+ $1,0 \text{ mol/l}$ Arg	++	75 %
1/20	1 mmol/l GSH+ $1,0 \text{ mol/l}$ Arg pH 7,0	++	31 %
1/20	1 mmol/l GSH+ $1,0 \text{ mol/l}$ Arg pH 9,0	++	48 %
1/100	---	+	$\leq 5 \%$
1/100	1 mmol/l GSH	+	20 %
1/100	1 mmol/l GSH+ $0,5 \text{ mol/l}$ Arg	++	76 %
1/100	1 mmol/l GSH+ $1,0 \text{ mol/l}$ Arg	++	46 %
1/100	1 mmol/l GSH+ $1,0 \text{ mol/l}$ Arg pH 7,0	++	36 %
1/100	1 mmol/l GSH+ $1,0 \text{ mol/l}$ Arg pH 8,0	++	52 %
1/100	1 mmol/l GSH+ $0,5 \text{ mol/l}$ Tris/HCl	/	33 %
1/100	1 mmol/l GSH+ $1,0 \text{ mol/l}$ Tris/HCl	/	91 %
1/100	1 mmol/l GSH+ $1,0 \text{ mol/l}$ Tris/HCl + $0,5 \text{ mol/l}$ Arg	++	100 %

*Die ELISA-Werte wurden jeweils auf das max. Signal bei
identischen Verdünnung bezogen.

Tabelle 2

Abhängigkeit der Renaturierungsausbeute von der Temperatur
bei der Renaturierung

Die Renaturierung erfolgt durch 100-fache Verdünnung von
gegen 6 mol/l GdmCl, 2 mmol/l EDTA, pH 3 dialysiertem Solubi-
lisat mit 50 mg IB/ml in 0,7 mol/l Arg, 2,0 mol/l Harn-
stoff, 0,1 mol/l Tris, 2 mmol/l EDTA, 5 mmol/l Cysteamin, 1
mmol/l Cystamin. Renaturierter β -NGF wurde mittels ELISA
bestimmt.

Temperatur	Renaturierungszeit (h)	β -NGF [mg/l]
4°C	10	0,8
4°C	24	1,4
4°C	48	2,6
20°C	10	0,17
20°C	24	0,4
20°C	48	0,4

Tabelle 3

Abhängigkeit der Renaturierungsausbeute von Solubilisaten und
Derivaten vom Redox-System in der Renaturierungslösung

Derivate und Solubilisate vor und nach Dialyse mit einer
Proteinkonzentration von 5 mg/ml wurden 1/100 in 0,5 mol/l
Arg, 0,1 mol/l Tris/HCl, 1 mmol/l EDTA, pH 8,5 verdünnt,
worin unterschiedliche Redox-Komponenten enthalten waren.

Die Ausbeuten wurden mit dem β -NGF-ELISA bestimmt und wurden auf den Ansatz mit maximaler Ausbeute normiert.

5

10

15

20

25

30

35

40

45

Denaturiertes β -NGF	Redox-Komponenten	rel. Ausbeute (%)
GSSG-Derivat	0,5 mmol/l GSH	61
GSSG-Derivat	0,5 mmol/l Cysteamin	63
GSSG-Derivat	0,5 mmol/l Cystein	51
Cysteamin-Derivat	0,5 mmol/l GSH	28
Cysteamin-Derivat	0,5 mmol/l Cysteamin	41
Cysteamin-Derivat	0,5 mmol/l Cystein	35
Solubilisat ohne Dialyse	2 mmol/l Cystamin	99
Solubilisat ohne Dialyse	10 mmol/l Cystamin	50
Solubilisat nach Dialyse	5 mmol/l GSH/1 mmol/l GSSG	35
Solubilisat nach Dialyse	5 mmol/l Cysteamin + 1 mmol/l Cystamin	100
Solubilisat nach Dialyse	3 mmol/l GSH/1 mmol/l GSH	67
Solubilisat nach Dialyse	3 mmol/l Cysteamin + 1 mmol/l Cystamin	99

Beispiel 5

Pulsrenaturierung von rec. β -NGF

50

20 g IB-Material wurde in 400 ml 6 mol/l GdmCl, 0,1 mol/l Tris HCl, 0,1 mol/l DTE, 2 mmol/l EDTA pH 8,5 gelöst und 1 h bei 20°C inkubiert. Anschließend wurde der pH-Wert der Lösung auf pH 3 mit 25 % HCl

Tabelle 4

Mit ELISA bestimmte β -NGF-Konzentration im Renaturierungsansatz nach Zugabe unterschiedlicher Volumina an dialysiertem Solubilisat		
Pulsanzahl	Zugegebenes Solubilisat	β -NGF-Konz. (mg/l)
1	100 ml	3,5
2	200 ml	5,3
4	400 ml	8,5

Beispiel 615 Reinigung von biologisch aktivem rec. β -NGF aus der Renaturierungslösung

Zu der in Beispiel 5 hergestellten Renaturierungslösung wurde festes Ammoniumsulfat portionsweise bis zu einer Sättigung von 20 % zugegeben und 1 h auf Eis gerührt. Der pH Wert der Lösung wurde anschließend mit 25 %iger HCl auf PH 3 eingestellt. Nach 30 Minuten Inkubation wurde mit 7 N NaOH auf
 20 pH 8 titriert. Trübungen wurden entweder durch Zentrifugation (1 h mit 20 000 g bei 4 °C) oder Filtration durch eine geeignete Membran mit geringer Proteinadsorption (z.B. Evaflex 4 A Hohlfaserpatrone der Fa. Kuraray Co. Ltd., Japan) entfernt. Die klare β -NGF enthaltende Lösung wurde dann auf eine TSK-Butyl-Säule (Fa. Pharmacia) aufgetragen, die vorher mit 50 mmol/l Tris/HCl, 1 mmol/l EDTA, 20 % Sättigung an $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, pH 7,5 äquilibriert wurde. Nach Beendigung des Probenauftrags wurde mit 50 mmol/l Tris/HCl,
 25 1 mmol/l EDTA pH 7,5 bis zum Erreichen der Schreibergrundlinie gespült. Die Elution erfolgte mit 50 % Ethylenglykol in 50 mmol/l Na-Acetat, 1 mmol/l EDTA, pH 4,5. Eluierende Fraktionen wurden mit dem ELISA (s. Beispiel 4) auf den Gehalt an β -NGF getestet. β -NGF enthaltende Fraktionen wurden vereint und auf eine Sephacryl S200-Säule (Fa. Pharmacia, Schweden) aufgetragen, die mit 0,5 mol/l NaCl, 50 mmol/l Na-Phosphat, 10 % Glycerin, 1 mmol/l EDTA, pH 6,0 äquilibriert war. Die Säule wurde mit demselben
 30 Puffer eluiert.

β -NGF enthaltende Fraktionen im Eluat wurden mit H_2O auf eine Leitfähigkeit von 15 mS verdünnt und auf eine mit 20 mmol/l Natriumphosphat, 1 mmol/l EDTA, pH 6,0 äquilibrierte S-Sepharose-Säule (Fa. Pharmacia) aufgetragen. Anschließend wurde mit dem Äquilibrierungspuffer gespült. Die Elution erfolgte mit einem Gradienten bis 1,2 mol/l NaCl in obigem Puffer. β -NGF enthaltende Fraktionen wurden vereinigt und,
 35 sofern für weitere Analysen erforderlich, durch Dialyse umgepuffert.

Tabelle 5

Ausbeuten der Reinigung von rec. β -NGF aus 20 l Renaturierungslösung nach Bestimmung mit ELISA		
Reinigungsschritt	β -NGF (mg)	Ausbeute (%)
Renaturierungslösung	170	100
vor TSK-Butyl	143	84
nach TSK-Butyl	92	54
nach S200	80	47
nach S-Sepharose	61	36

50 Beispiel 7

1. Schritt: Reinigung von rec. β -NGF aus 20 l Renaturierungslösung

Die Lösung (40 ml) wurde in 50 mmol/l Tris/HCl, pH 7,5, 1 mmol/l EDTA, pH 7,5, 20 % Glycerin in 50 mmol/l Na-Acetat, pH 4,5 gegeben und mit einem UV-Vis-Spektrophotometer (z.B. Diadenarray-Spektrophotometer T-1, EP 2452 A der Fa. Hewlett-Packard,

USA) gemessen. Die β -NGF-Konzentration in der Lösung wurde aus der Absorption der Probe bei 280 nm berechnet. Hierzu wurde ein theoretischer molarer Extinktionskoeffizient von $21200 \pm 100 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ verwendet, der sich aus dem Gehalt an bei dieser Wellenlänge absorbierenden Aminosäuren ergibt (Wetlaufer, D.B., 1962, Adv. in Protein Chemistry, Vol. 17, 375-383; Gill, S.C. und von Hippel, P.H., 1989, Anal.Biochem. 182, 319-326). Als Molekulargewicht wurden 14000 D verwendet. Die mittels Absorption errechneten Werte ergaben eine um ca. 50 % niedrigere β -NGF-Konzentration als mit ELISA bestimmt wurde. Ursache könnte die geringere Reinheit des als Referenz verwendeten 2,5 S-NGF (aus Maus) sein, weshalb die mit ELISA ermittelten Werte für rec. β -NGF zu hoch sind.

b) Reinheitsanalyse und Molekulargewichtsbestimmung mit SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese:

Es wurden 17 %ige Gele in einem Midget-System (Fa. Pharmacia, Schweden) verwendet. Die Proben enthielten jeweils 10 mmol/l DTE sowie nach Absorption bei 280 nm berechnet 6 μg bzw. 1,5 μg rec. β -NGF sowie 8,4 μg bzw. 2,1 μg 2,5 S-NGF aus Submaxillaris-Drüsen der Maus. rec. β -NGF hat wie erwartet mit ca. 15 kD ein etwas höheres Molekulargewicht als 2,5 S-NGF mit ca. 12,5 kD. Die Bande im Molekulargewichtsbereich des dimeren rec. β -NGF tritt in Abhängigkeit von der Probenvorbereitung und vom Probenalter in unterschiedlicher Intensität auf und kann auf die Bildung Disulfid-verbrückter Moleküle bei der Probenvorbereitung zurückgeführt werden. Die densitometrische Vermessung einer Gelspur (Ultrascan XL Laser Densitometer, Fa. Pharmacia, Schweden) mit rec. β -NGF ergab 93% Monomer und 7 % Dimer.

c) Reinheitsanalyse mit RP-C18-HPLC:

20 μg rec. β -NGF wurden auf eine mit 0,1 % TFA äquilibrierte Vydac 300, C18, 5 μ , 125 x 4 mm-Säule aufgetragen und bei einer Flußrate von 1 ml/Minute mit einem gestuften Gradienten von 0 bis 40 % B (B = Acetonitril/0,1% TFA) in 20 Minuten und 40 - 100 % B von 20 bis 25 Minuten eluiert. Zur Detektion wurde die Fluoreszenzemission bei 340 nm nach Anregung bei 280 nm (Merck/Hitachi F-1050 Fluorescence Spektrophotometer) benutzt. Die Integration des Elutionsdiagramms ergab eine Reinheit von 92 %. Identische Ergebnisse wurden mit UV-Detektion bei 280 nm erhalten. Die Identität des Elutionspeaks mit β -NGF wurde nach Sammeln und Einengen mittels Speed Vac durch ELISA und N-terminale Sequenzierung überprüft.

d) Reinheitsanalyse von rec. β -NGF mit SEC-HPLC:

30 μl einer gereinigten rec. β -NGF-Lösung mit einer Absorption bei 280 nm von 1.3 wurden auf eine Superose 6-Säule Typ HR 10/30 (Fa. Pharmacia, Schweden) aufgetragen und mit 0.7 mol/l Arginin, 0.1 mol/l Tris, pH 8,5 bei einem Fluß von 0,5 ml/Minute eluiert. Es wurde die Absorption bei 280 nm detektiert. Abb. 9 zeigt das Elutionsdiagramm im Vergleich zu einer Probe des 2,5 S-NGF aus Maus.

e) N-terminale Sequenzanalyse:

Für die N-terminale Sequenzanalyse wurde das in Beispiel 7c mittels RP-HPLC isolierte und anschließend konzentrierte β -NGF verwendet. Die N-terminale Sequenz wurde mit einem Gasphasen-Protein-Sequenzanalysator (Modell 477 A, Fa. Applied Biosystems, USA) durchgeführt. Es wurde folgende Sequenz mit einer Signalstärke von ca. 400 pmol pro PTH-Aminosäure gefunden:

H₂ N-Ser-Tyr-Gln-Arg-Thr-His-Arg-Ser (SEQ ID NO 7)

Die N-terminale Aminosäure Methionin wird in E.coli offenbar bereits abgespalten.

f) Biologische Aktivität des rec. β -NGF und deren Inhibition durch Anti-NGF- β -Antikörper:

Der DRG-Test zur Bestimmung der biologischen Aktivität von β -NGF wurde wie in Beispiel 4 beschrieben durchgeführt. Als Proben wurde das isolierte rec. β -NGF nach Proteinbestimmung mittels Absorption

Tabelle 6

Biologische Aktivität von rec. β -NGF und deren Inhibition durch Anti-NGF- β -Antikörper			
β -NGF-Spezies	β -NGF-Konz. (ng/ml)	Antikörper (ng/ml)	biologische Aktivität
rec. β -NGF	20.0	---	+++
rec. β -NGF	2.0	---	+++
rec. β -NGF	0.2	---	++
rec. β -NGF	20.0	200	+/-
rec. β -NGF	2.0	200	-
rec. β -NGF	0.2	200	-
2,5 S β -NGF	20.0	---	+++
2,5 S β -NGF	2.0	---	++
2,5 S β -NGF	0.2	---	++
2,5 S β -NGF	20.0	200	+
2,5 S β -NGF	2.0	200	-
2,5 S β -NGF	0.2	200	-

Beispiel 8:

Herstellung und Charakterisierung N-terminal verkürzter rec. β -NGF-Moleküle

Zur Herstellung N-terminal verkürzter rec. β -NGF-Moleküle wurde eine gereinigte Probe gegen 50 mM Tris-HCl, pH 7,7 dialysiert. Die Konzentration wurde mittels der Absorption der Probe bei 280 nm (siehe Beispiel 7a) mit 0,7 mg/ml bestimmt.

Verkürzte rec. β -NGF-Moleküle wurden durch Verdau mit den Endoproteinasen Trypsin und Arg C in folgenden Verdauansätzen hergestellt.

a) rec. NGF + Trypsin: 22 °C

200 μ l rec. β -NGF-Dialysat

+ 60 μ l Trypsin sequence grade-Lösung

(100 μ g/200 μ l 0,1 mol/l Tris, pH 8,0)

b) rec. NGF + Endoproteinase Arg C: 37 °C

200 μ l rec. β -NGF-Dialysat

+ 20 μ l 50 mmol/l CaCl_2 , 50 mmol/l DTE

100 mmol/l Tris-HCl, pH 7,6

+ 40 μ l Endoproteinase Arg C-Lösung

(20 μ g in 40 μ l 250 mmol/l Tris-HCl, 25 mmol/l DTE, 2,5 mmol/l EDTA, 5 mmol/l CaCl_2 pH 7,8)

c) rec. NGF ohne Protease: 22 °C

200 μ l rec. β -NGF-Dialysat

+ 60 μ l 50 mmol/l Tris HCl pH 7,7

Weiterhin wurden analoge Kontroll-Lösungen mit den Proteasen angesetzt, die anstelle von rec. β -NGF den Dialysepuffer enthielten. Die Ansätze wurden 5 Stunden bei den entsprechenden Temperaturen inkubiert. Anschließend wurden je 200 μ l der Ansätze auf eine mit 20 mmol/l Natriumphosphat pH 6,0 äquilibrierte Mono S-Säule Typ HR 5/5 (Fa. Pharmacia) mit einer Flußrate von 1 ml/Minute aufgetragen und mit einem linearen Gradienten von 0 - 1,2 mol/l NaCl eluiert. Es wurde die Absorption bei 280 nm detektiert. Die Kontrollansätze nur mit Proteasen ergaben, daß diese innerhalb der ersten 10 Minuten der Chromatographie eluieren. β -NGF-enhaltende Fraktionen eluieren je nach Verkürzung erst mit einer Retentionszeit von mindestens 10 Minuten. Die Elutionsdiagramme der Chromatographien von rec. β -NGF-enhaltenden

Fraktionen wurden bestimmt. Die Fraktionen wurden auf β -NGF-Konzentrationen von 20, 10 und 5 ng/ml in einer ^{125}I -Test verblindet, um die biologische Aktivität der verkürzten β -NGF-Moleküle zu bestimmen. Die Ergebnisse sind

biologischen Aktivität mit einem anti- β -NGF-Antikörper erfolgte wie in Beispiel 7f beschrieben.

Die Ergebnisse der Sequenzanalyse und des Zelltests sind in Tabellen 7 und 8 zusammengefaßt.

Tabelle 7

N-terminale Sequenzen der proteolytisch verkürzten β -NGF-Moleküle			
verwendete Protease	Retent.zeit β -NGF auf MonoS	N-terminale Sequenz	Position * 1. A.S.
---	18,5 Minuten	Ser Tyr Gln Arg Thr His Arg Ser (SEQ ID NO 7)	- 9
Trypsin	13,4 Minuten	Gly Glu Phe Ser Val Cys Asp Ser (SEQ ID NO 8)	+ 10
Trypsin	14,2 Minuten	Ser Ser Ser His Pro Ile Phe His (SEQ ID NO 9)	+ 1
Arg C	14,6 Minuten	Ser Ser Ser His Pro Ile Phe His (SEQ ID NO 10)	+ 1

*Die angegebenen Positionen der jeweils ersten identifizierten Aminosäure (= A.S.) beziehen sich auf die Nummerierung der Aminosäuren in Abb. 2.

Tabelle 8

Biologische Aktivität von N-terminal verkürzten β -NGF im DRG-Test			
β -NGF-spezies	β -NGF-Konz (ng/ml)	Antikörper (ng/ml)	biologische Aktivität
rec β -NGF (unverdaut)	20	---	+++
	10	---	+++
	20	200	-
Trypsinverdau peak 13,4 Minuten	20	---	+++
	10	---	+++
	20	200	-
Trypsinverdau peak 14,2 Minuten	20	---	+++
	10	---	+++
	20	200	-
Arg C-Verdau	20	---	+++
	10	---	+++
	20	200	-

SEQUENCE LISTING

(1) GENERAL INFORMATION:

- 5 (i) APPLICANT:
 (ii) TITLE OF INVENTION:
 (iii) NUMBER OF SEQUENCES: 10
 (iv) COMPUTER READABLE FORM:
 10 Not Applicable
 (v) CURRENT APPLICATION DATA:
 APPLICATION NUMBER:

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:1:

- 15 (i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:
 (A) LENGTH: 129 amino acids
 (B) TYPE: amino acid
 (C) STRANDEDNESS: single
 (D) TOPOLOGY: linear
 20

(ii) MOLECULE TYPE: protein

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:1:

25 Met Ser Tyr Gln Arg Thr His Arg Ser Lys Arg Ser Ser Ser His Pro
 1 5 10 15
 Ile Phe His Arg Gly Glu Phe Ser Val Cys Asp Ser Val Ser Val Trp
 30 20 25 30
 Val Gly Asp Lys Thr Thr Ala Thr Asp Ile Lys Gly Lys Glu Val Met
 35 35 40 45
 Val Leu Gly Glu Val Asn Ile Asn Asn Ser Val Phe Lys Gln Tyr Phe
 50 55 60
 Phe Glu Thr Lys Cys Arg Asp Pro Asn Pro Val Asp Ser Gly Cys Arg
 65 70 75 80
 Gly Ile Asp Ser Lys His Trp Asn Ser Tyr Cys Thr Thr Thr His Thr
 40 85 90 95
 Phe Val Lys Ala Leu Thr Met Asp Gly Lys Gln Ala Ala Trp Arg Phe
 100 105 110
 Ile Arg Ile Asp Thr Ala Cys Val Cys Val Leu Ser Arg Lys Ala Val
 45 115 120 125
 Arg

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:2:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:
 (A) LENGTH: 7 amino acids
 (B) TYPE: amino acid
 (C) STRANDEDNESS: single
 (D) TOPOLOGY: linear

(ii) MOLECULE TYPE: peptide

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:2:

Arg Thr His Arg Ser Lys Arg
 1 5

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:3:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:
 (A) LENGTH: 3 amino acids
 (B) TYPE: amino acid
 (C) STRANDEDNESS: single
 (D) TOPOLOGY: linear

(ii) MOLECULE TYPE: peptide

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:3:

Ser Tyr Gln
 1

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:4:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:
 (A) LENGTH: 5 amino acids
 (B) TYPE: amino acid
 (C) STRANDEDNESS: single
 (D) TOPOLOGY: linear

(ii) MOLECULE TYPE: peptide

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:4:

Ser Tyr Gln Val Ile
 1 5

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:5:

- (i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:
 (A) LENGTH: 40 base pairs
 (B) TYPE: nucleic acid
 (C) STRANDEDNESS: single
 (D) TOPOLOGY: linear

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:5:

AATTCTTATG TCTTACCAA GAACTCACCG TAGCAAGCGC

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:6:

- (i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:
 (A) LENGTH: 40 base pairs
 (B) TYPE: nucleic acid
 (C) STRANDEDNESS: single
 (D) TOPOLOGY: linear

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:6:

ATGAGCGCTT GCTACGGTGA GTTCTTTGGT AAGACATAAG

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:7:

- (i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:
 (A) LENGTH: 8 amino acids
 (B) TYPE: amino acid
 (C) STRANDEDNESS: single
 (D) TOPOLOGY: linear

(ii) MOLECULE TYPE: peptide

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:7:

Ser Tyr Gln Arg Thr His Arg Ser
 1 5

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:8:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:
 (A) LENGTH: 8 amino acids
 (B) TYPE: amino acid
 (C) STRANDEDNESS: single
 (D) TOPOLOGY: linear

(ii) MOLECULE TYPE: peptide

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:8:

Gly Glu Phe Ser Val Cys Asp Ser
 1 5

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:9:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:
 (A) LENGTH: 8 amino acids
 (B) TYPE: amino acid
 (C) STRANDEDNESS: single
 (D) TOPOLOGY: linear

(ii) MOLECULE TYPE: peptide

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:9:

Ser Ser Ser His Pro Ile Phe His
 1 5

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:10:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:
 (A) LENGTH: 8 amino acids
 (B) TYPE: amino acid
 (C) STRANDEDNESS: single
 (D) TOPOLOGY: linear

(ii) MOLECULE TYPE: peptide

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:10:

Ser Ser Ser His Pro Ile Phe His
 1 5

dadurch gekennzeichnet,

daß man eine DNA-Sequenz verwendet, welche in 5'-3'-Richtung zusammengesetzt ist aus Sequenzen, die für

(a) Methionin als Startamino-säure,

(b) 3 bis 5 Aminosäuren einer N-terminalen Sequenz eines Proteins, welches in den verwendeten Wirtszellen mit einer hohen Expressionsrate exprimierbar ist.

(c) 4 bis 10 Aminosäuren aus der Pro-Sequenz des β -NGF-Precursors und

(d) die 118 Aminosäuren des reifen β -NGF

codieren, die nach Expression erhaltenen unlöslichen Aggregate von inaktivem β -NGF durch

(1) Solubilisierung,

(2) gegebenenfalls Dialyse oder/und Derivatisierung des erhaltenen β -NGF mit der oxidierten Form einer Verbindung, deren reduzierte Form Sulfhydrylgruppen aufweist und deren oxidierte Form ein über eine Disulfidbrücke verbundenes Dimer der Verbindung ist, zum gemischten Disulfid, und

(3) Naturierung mit Hilfe eines Redoxsystems, bestehend aus einer Verbindung in oxidierte oder/und reduzierter Form, deren reduzierte Form Sulfhydrylgruppen aufweist und deren oxidierte Form ein über eine Disulfidbrücke verbundenes Dimer ist, in eine lösliche aktive Form überführt und gegebenenfalls anschließend mit Hilfe einer Protease die Aminosäuren der Sequenzen (a) und/oder (b) und/oder (c) abgespalten.

2. Verfahren nach Anspruch 1,

dadurch gekennzeichnet,

daß zusätzlich zu den Sequenzen (b) und (c) noch bis zu 9 Aminosäuren von der N-terminalen Seite der Sequenz (d) abgespalten werden.

3. Verfahren nach Anspruch 1 oder 2,

dadurch gekennzeichnet,

daß man eine DNA-Sequenz verwendet, welche als Aminosäuren (b) für 3-5 Aminosäuren der N-terminalen Sequenz von tPA codiert.

4. Verfahren nach Anspruch 3,

dadurch gekennzeichnet,

daß die DNA-Sequenz für die Aminosäuresequenz (b) Ser-Tyr-Gln codiert.

5. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche,

dadurch gekennzeichnet,

daß die (c) entsprechende DNA-Sequenz für solche Aminosäuren der Pro-Sequenz von β -NGF codiert, welche sich im β -NGF-Precursor direkt vor der Position + 1 des reifen Proteins befinden.

6. Verfahren nach Anspruch 5,

dadurch gekennzeichnet,

daß die (c) entsprechende DNA-Sequenz für die Aminosäuresequenz Arg-Thr-His-Arg-Ser-Lys-Arg (SEQ ID NO 2) codiert.

7. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche,

dadurch gekennzeichnet,

daß man die Solubilisierung mit Hilfe eines Denaturierungsmittels, insbesondere Guanidiniumhydrochlorid oder Harnstoff durchführt.

8. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche,

dadurch gekennzeichnet,

daß man für die Derivatisierung oxidiertes Glutathion (GSSG), Cystin oder Cystamin verwendet.

10. Verfahren nach Anspruch 8,
dadurch gekennzeichnet,
daß man ohne vorhergehende Derivatisierung die Naturierung mit Cystamin, GSSG oder Cystin bzw. den Redoxsystemen Cystamin/Cysteamin, GSH/GSSG oder Cystin/Cystein durchführt.
11. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche,
dadurch gekennzeichnet,
daß man die Solubilisierung, Dialyse, Derivatisierung und Naturierung bei einer Temperatur zwischen 0 und 30 °C durchführt.
12. Verfahren nach Anspruch 11,
dadurch gekennzeichnet,
daß man die Naturierung bei 2 bis 10 °C und über einen Zeitraum von 2 bis 60 Stunden durchführt.
13. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche,
dadurch gekennzeichnet,
daß man die Abspaltung der Sequenzen (a), (b) und (c), sowie bis zu 9 Aminosäuren der Sequenz (d) mit Trypsin, Endoproteinase Arg C oder einer Protease homologer Spezifität durchführt.
14. Rekombinant hergestellter β -NGF,
dadurch gekennzeichnet,
daß er weniger als 5% β -NGF-Abbauprodukte oder durch einen Met-Rest am N-Terminus modifizierten β -NGF aufweist und vorzugsweise frei ist von anderen Säugerzellproteinen.
15. Rekombinanter N-terminal verlängerter β -NGF,
dadurch gekennzeichnet,
daß er gegenüber reifem humanem β -NGF aminoterminal zusätzlich eine 3 bis 5 Aminosäuren lange N-terminale Sequenz eines Proteins, welches in Prokaryonten als Wirtszellen mit hoher Expressionsrate exprimierbar ist, sowie 4 bis 10 Aminosäuren der Pro-Sequenz des Precursors von humanem β -NGF aufweist.
16. Rekombinanter N-terminal verlängerter β -NGF nach Anspruch 15,
dadurch gekennzeichnet,
daß er als N-terminale Sequenz die N-terminale Aminosäuresequenz Ser-Tyr-Gln (SEQ ID NO 3) von tPA aufweist.
17. Rekombinanter N-terminal verlängerter β -NGF nach Anspruch 15 oder 16,
dadurch gekennzeichnet,
daß er als Pro-Sequenz (c) Aminosäuren aufweist, die im β -NGF-Precursor direkt vor der Anfangsaminosäure +1 des reifen natürlichen humanen β -NGF liegen, insbesondere die letzten 7 Aminosäuren.
18. Rekombinanter N-terminal verkürzter β -NGF,
dadurch gekennzeichnet,
daß er an der N-terminalen Seite der normalerweise 118 Aminosäuren um bis zu 9 Aminosäuren verkürzt ist.
19. DNA-Sequenz,
dadurch gekennzeichnet,
daß sie für einen rekombinanten N-terminal verlängerten β -NGF nach einem der Ansprüche 15 bis 17 codiert.
20. Plasmid pNGF 1
21. In vitro synthetisierte Peptidsequenz, die die N-terminale Sequenz des verlängerten β -NGF nach einem der Ansprüche 15 bis 17 darstellt.
22. In vitro synthetisierte Peptidsequenz, die die N-terminale Sequenz des verkürzten β -NGF nach einem der Ansprüche 15 bis 17 darstellt.

EP 0 544 293 A2

bis 18 in Kombination mit üblichen Träger- und Hilfsstoffen.

5

10

15

20

25

30

35

40

45

50

Abb.1

Plasmid pNGF1

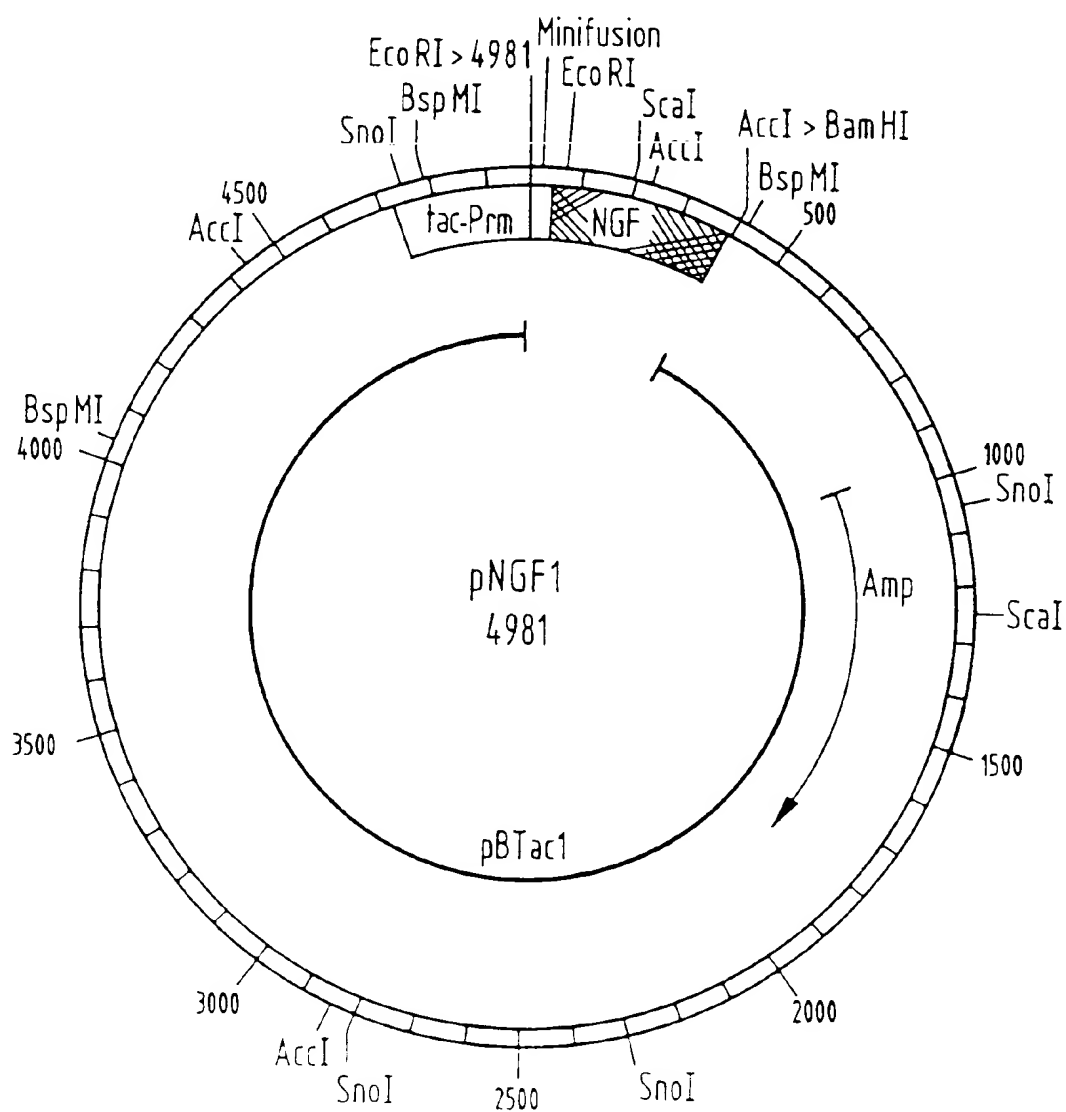


Abb. 2

PRIMÄRSTRUKTUR DES EXPRIMIERTEN GEGNÜG MIT
NATIVER DISULFIDVERBRÜCKUNG

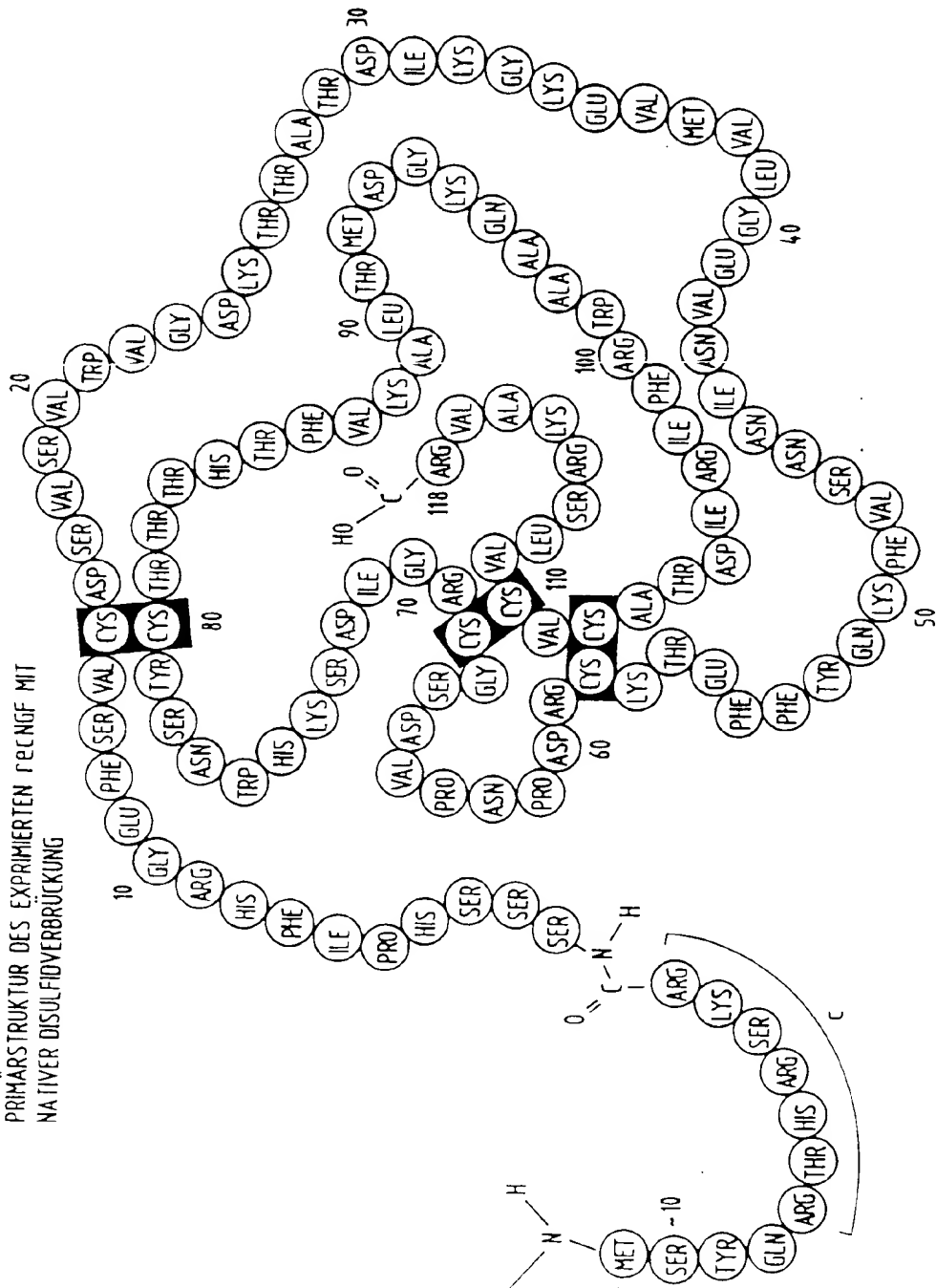


Abb. 3

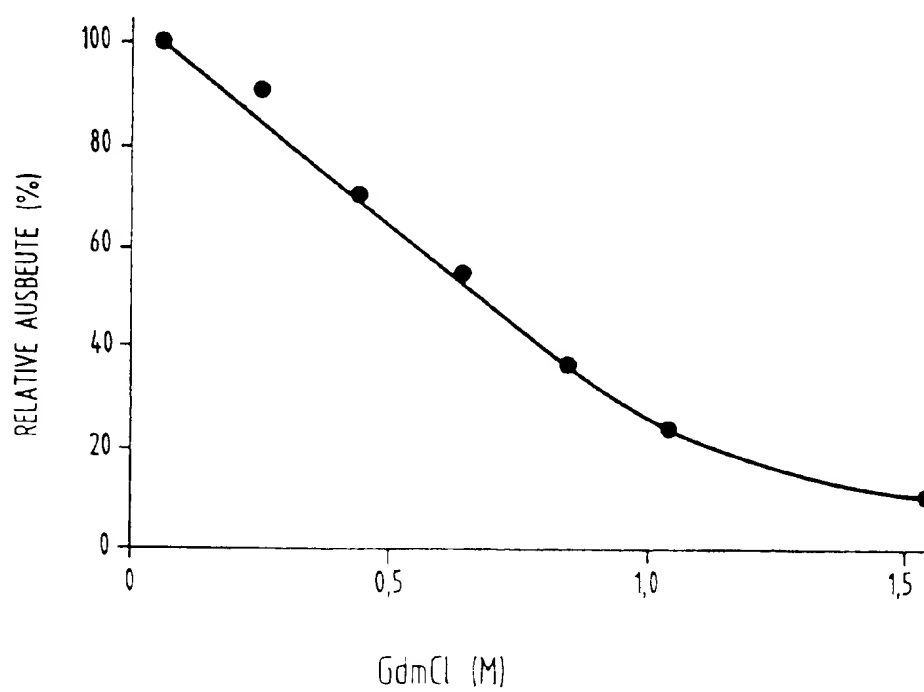


Abb. 4

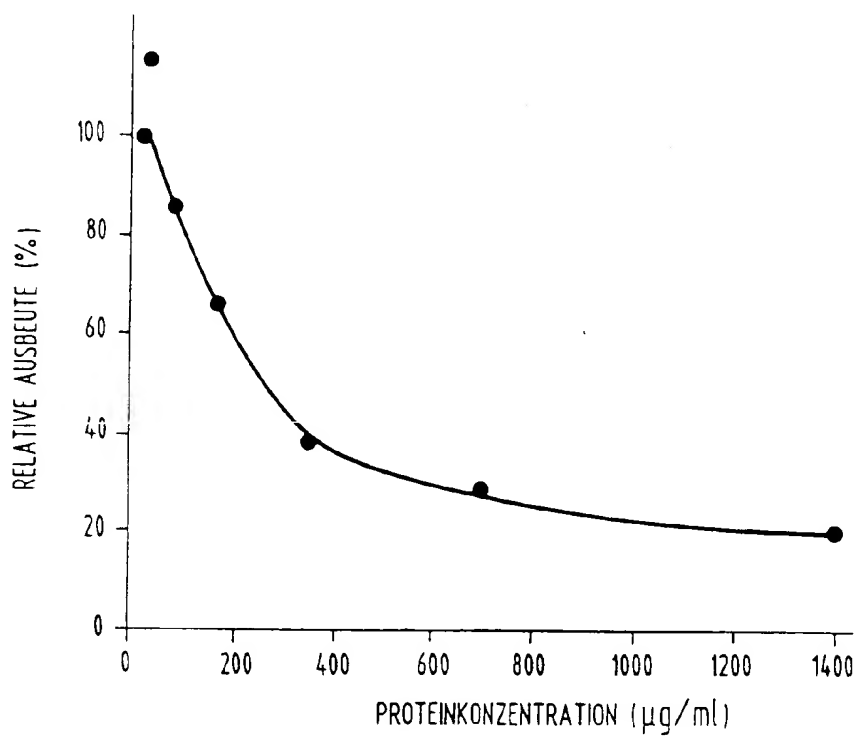


Abb. 5

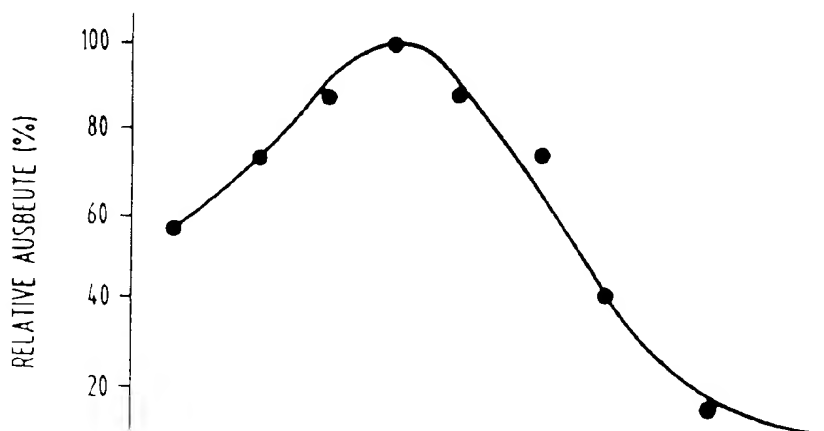


Abb. 6

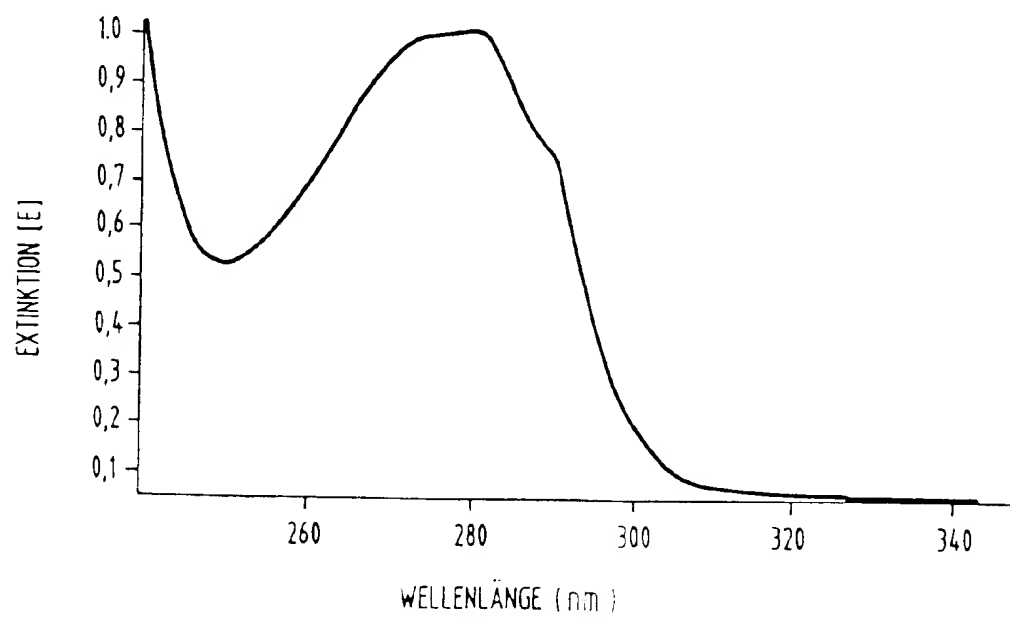


Abb. 7

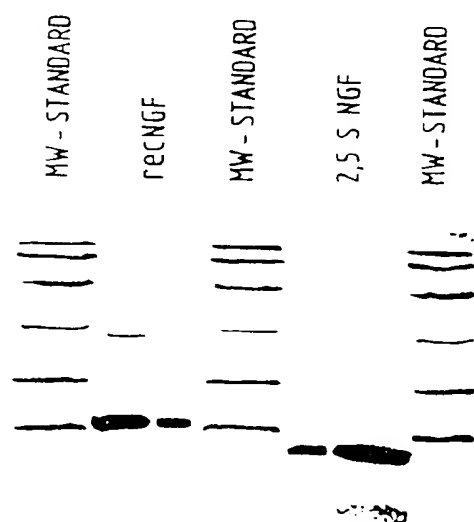


Abb. 8

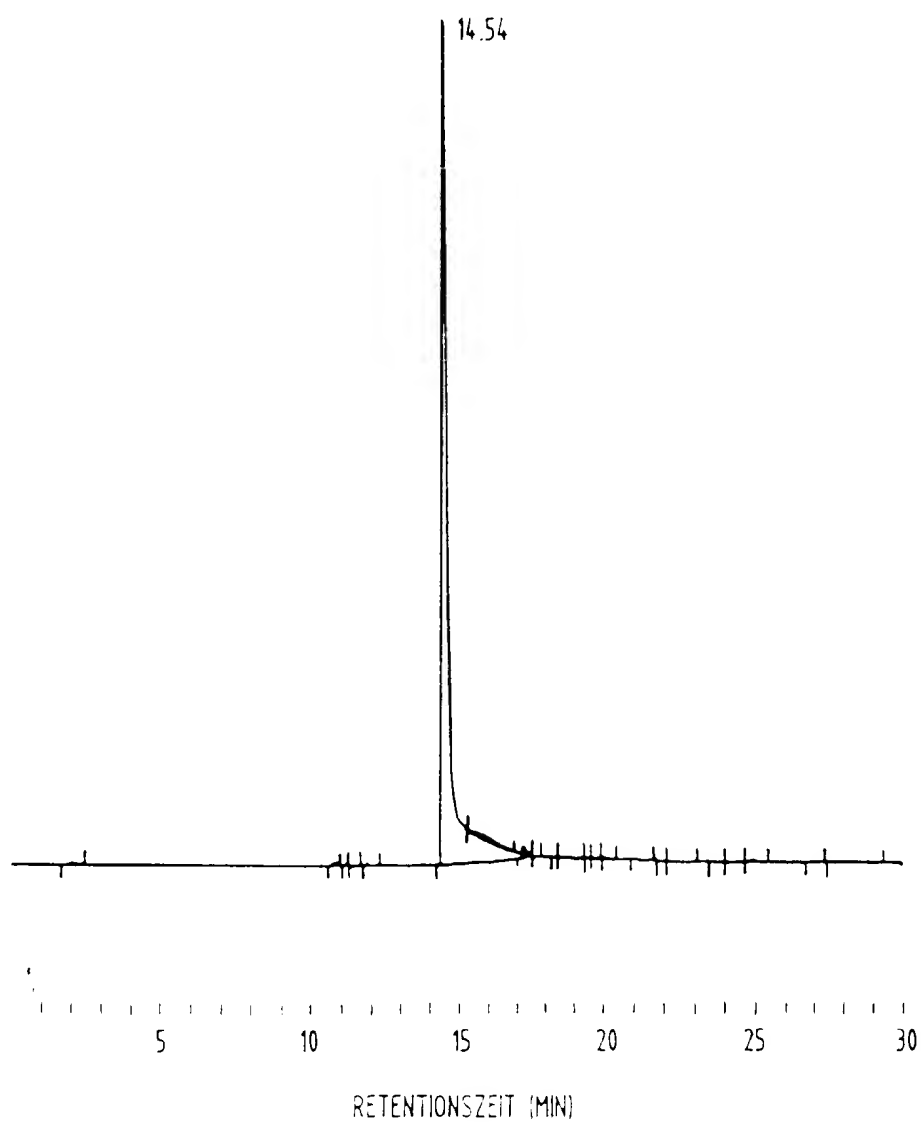
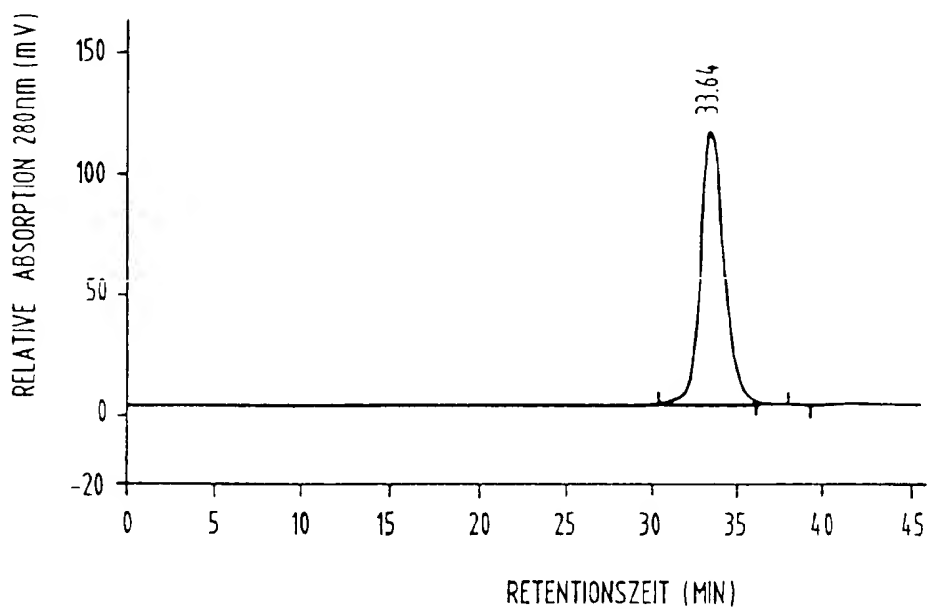


Abb. 9

(a)



(b)

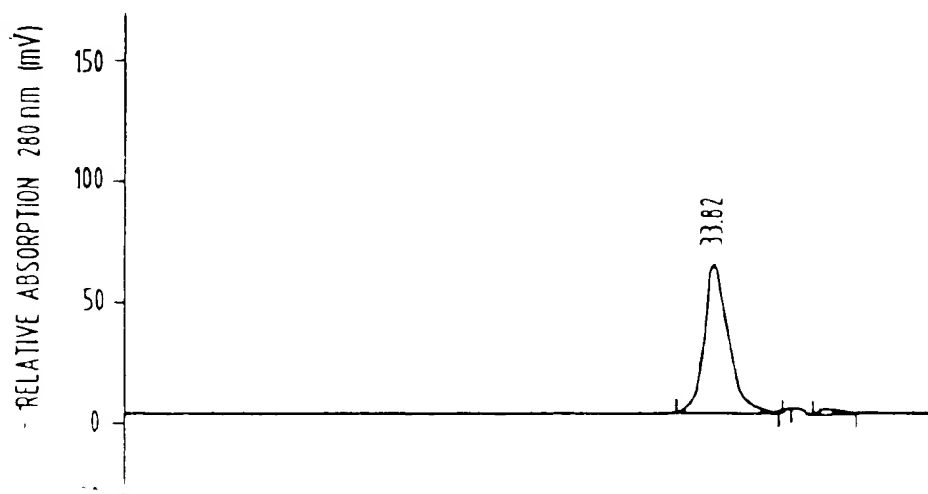


Abb.10a

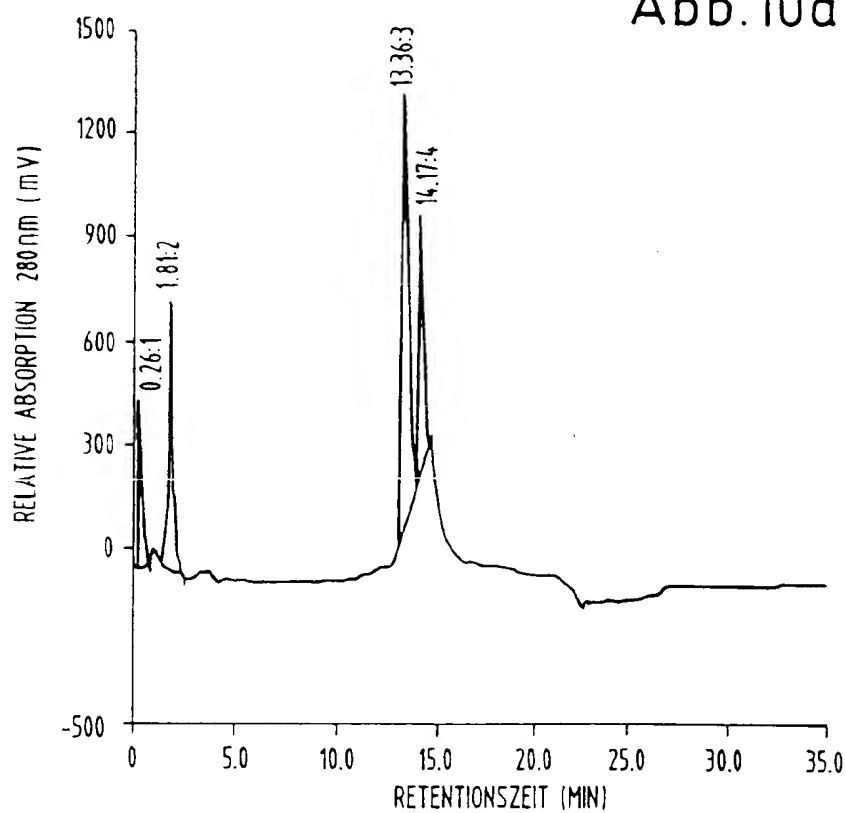


Abb.10b

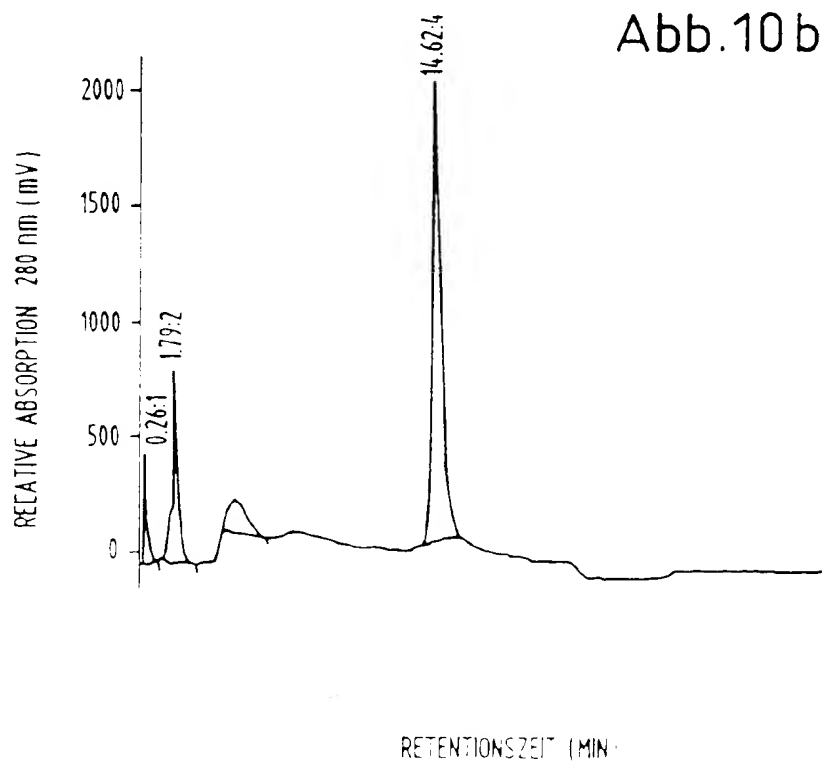
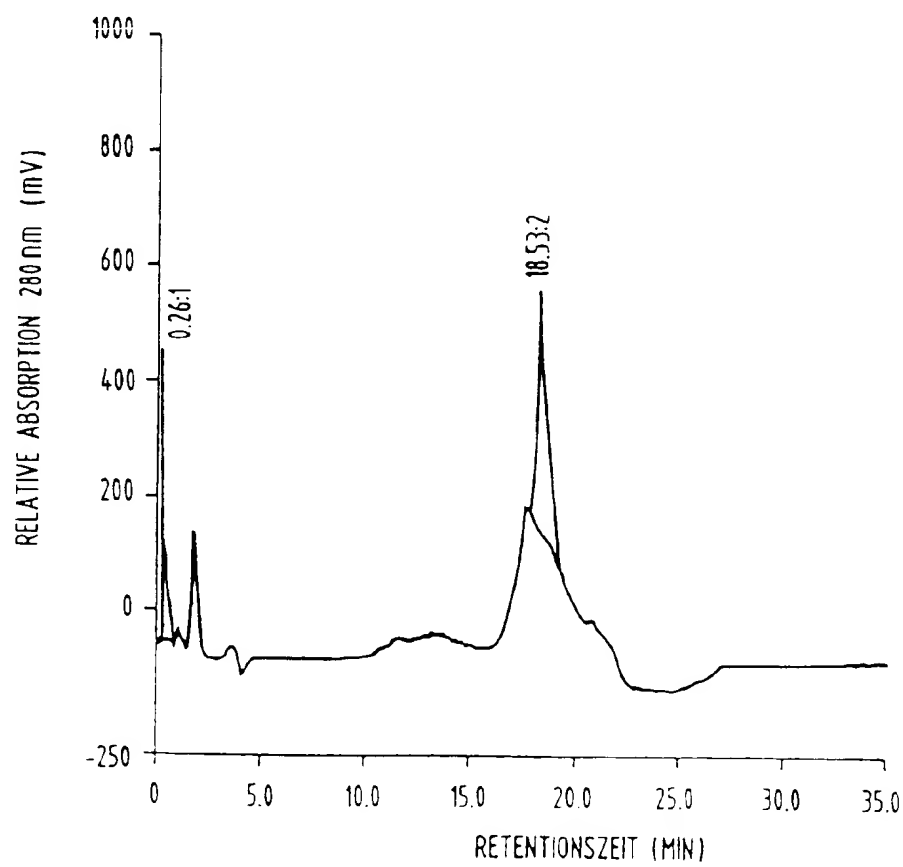


Abb.10c





Europäisches Patentamt
European Patent Office
Office européen des brevets



(11) Veröffentlichungsnummer: **0 544 293 A3**



EUROPÄISCHE PATENTANMELDUNG

(21) Anmeldenummer: **92120207.3**

(42) Anmeldetag: **26.11.92**

(51) Int. Cl.⁵ **C12N 15/12, C12N 15/62,
C12N 15/58, A61K 37/02,
C07K 3/08, C12N 1/21,
//(C12N1/21,C12R1:19)**

(30) Priorität: **27.11.91 DE 4139000**

(43) Veröffentlichungstag der Anmeldung:
02.06.93 Patentblatt 93/22

(84) Benannte Vertragsstaaten:
**AT BE CH DE DK ES FR GB GR IE IT LI LU NL
PT SE**

(88) Veröffentlichungstag des später veröffentlichten
Recherchenberichts: **21.09.94 Patentblatt 94/38**

(71) Anmelder: **BOEHRINGER MANNHEIM GMBH**
D-68298 Mannheim (DE)

(72) Erfinder: **Lang, Kurt, Dr.**
Langoner Strasse 10
W-8122 Penzberg (DE)
Erfinder: **Bartke, Ilse, Dr.**

Eichenstrasse 25
W-8139 Bernried (DE)
Erfinder: **Naujoks, Kurt, Dr.**
Buchenstrasse 3
W-8122 Penzberg (DE)
Erfinder: **Rudolph, Rainer, Prof. Dr.**
Färbergasse 17
W-8120 Weilheim (DE)
Erfinder: **Stern, Anne, Dr.**
Karwendelstrasse 10
W-8122 Penzberg (DE)

(74) Vertreter: **Huber, Bernhard, Dipl.-Chem. et al**
Patentanwälte
H. Welckmann, Dr. K. Fincke
F.A. Weickmann, B. Huber
Dr. H. Liska, Dr. J. Prechtel, Dr. B. Böhm
Postfach 86 08
20
D-81635 München (DE)

(54) **Verfahren zur gentechnologischen Herstellung von biologisch aktivem beta-NGF.**

(61) Zur gentechnologischen Herstellung von biologisch aktivem β -NGF (Nerve Growth Factor) durch Expression einer entsprechenden DNA-Sequenz in Prokaryonten als Wirtszellen, verwendet man eine DNA-Sequenz, welche in 5'-3'-Richtung zusammengesetzt ist aus Sequenzen, die für

- (a) Methionin als Startamino-säure,
- (b) 3 bis 5 Aminosäuren einer N-terminalen Sequenz eines Proteins, welches in den verwendeten Wirtszellen mit einer hohen Expressionsrate

- (1) Solubilisierung,
- (2) gegebenenfalls Dialyse oder/und Derivatisierung des erhaltenen β -NGF mit der oxidierten Form einer Verbindung, deren reduzierte Form Sulfhydrylgruppen aufweist und deren oxidierte Form ein über eine Disulfidbrücke verbundenes Dimer der Verbindung ist, zum gemischten Disulfid, und
- (3) Naturierung mit Hilfe eines Redoxsystems, bestehend aus einer Verbindung in oxidiertem Zustand, die in Gegenwart einer Reduktionsmittel-Substanz vorliegt, und einer Verbindung in reduzierter Form, die in Gegenwart einer Oxidationsmittel-Substanz vorliegt.

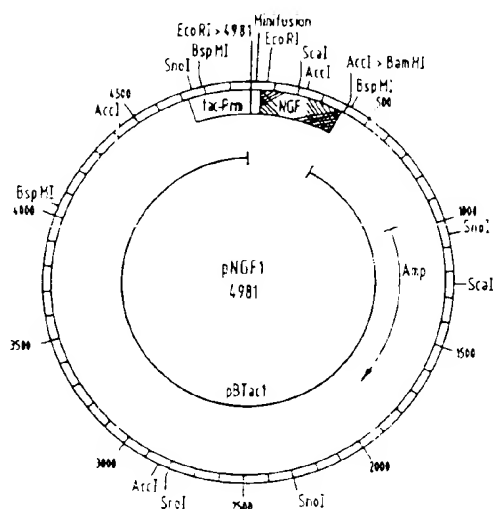
und oder (c) und/oder bis zu 9 N-terminale Aminosäuren der Sequenz (d) ab. Man erhält einen aktiven β -NGF, der weniger als 5 % β -NGF-Abbauprodukte oder durch einen Met-Rest am N-Terminus modifi-

zierten β -NGF aufweist und vorzugsweise frei ist von anderen Säugerzellproteinen und N-terminal verkürzt oder verlängert sein kann.

NGF aufweist und vorzugsweise frei ist von anderen Säugerzellproteinen und N-terminal verkürzt oder verlängert sein kann.

Abb. 1

Plasmid pNGF1





Europäisches
Patentamt

EUROPÄISCHER RECHERCHENBERICHT

Nummer der Anmeldung
EP 92 12 0207

EINSCHLÄGIGE DOKUMENTE			
Kategorie	Kennzeichnung des Dokuments mit Angabe, soweit erforderlich, der maßgeblichen Teile	Betrifft Anspruch	KLASSIFIKATION DER ANMELDUNG (Int.Cl.5)
D,X	EP-A-0 414 151 (TAKEDA CHEMICAL INDUSTRIES LTD.) * Seite 3, Zeile 37 - Seite 5, Zeile 5 * * Seite 6, Zeile 24 - Zeile 25 * ---	14, 18, 21, 22	C12N15/12 C12N15/62 C12N15/58 A61K37/02 C07K3/08
D,X	EP-A-0 450 386 (SYNERGEN, INC.) * Seite 18, Zeile 14 - Zeile 50 * * Beispiele 2, 3A-B * ---	21, 22	C12N1/21 //(C12N1/21, C12R1:19)
A	---	1, 7-12	
D,X	GENE Bd. 70 , 1988 , AMSTERDAM NL Seiten 57 - 65 GUO-LU, H. & NEET, K. 'Expression of the cDNA for mouse beta-nerve growth factor protein in Escherichia coli' * Abbildung 2 * ---	14, 18	
D,A	EP-A-0 219 874 (BOEHRINGER MANNHEIM GMBH) * Beispiele 1, 4 * ---	1, 7-12	
E	EP-A-0 544 292 (BOEHRINGER MANNHEIM GMBH) * Beispiel 3 * -----	1, 3-17, 19-22	RECHERCHIERTE SACHGEBIETE (Int.Cl.5) C07K C12N A61K
Der vorliegende Recherchenbericht wurde für alle Patentansprüche erstellt			
Recherchenamt		Abschlußdatum der Recherche	
DEN HAAG		1. August 1994	
		Prüfer	
		Andres, S	
RECHERCHIERTE SACHGEBIETE (Int.Cl.5) besonderer Bedeutung eines Gebiets besonderer Bedeutung in Verbindung mit seiner Veröffentlichung derselben Kategorie technologischer Hintergrund schriftliche Offenbarung Zwischenliteratur der Anmeldung zugrunde liegenden Erfindungen des Patentanspruchs, die in dem Dokument in dem Anmeldedatum veröffentlicht wurden bei Anmeldung angeführten Dokumenten angeführten angeführten Dokumenten Mitglied der gleichen Patentfamilie, überreichtes Dokument			